

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

10/088699  
PCT/JPO/06313

14.09.00

JPO/6313

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2000年 6月29日

RECD 06 NOV 2000

WIPO PCT

出願番号  
Application Number:

特願2000-201456

出願人  
Applicant(s):

学校法人 慶應義塾

4

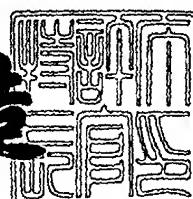
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3085469

【書類名】 特許願

【整理番号】 KUV-102DP1

【提出日】 平成12年 6月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区若宮町15蔵田101

【氏名】 西本 征央

【特許出願人】

【識別番号】 899000079

【氏名又は名称】 学校法人慶應義塾

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第264679号

【出願日】 平成11年 9月17日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経細胞死を抑制するポリペプチド、Humanin

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(I)

Pro-Xn<sub>1</sub>-Cys-(Leu/Arg)-Xn<sub>2</sub>-Leu-Thr-(Gly/Ser)-Xn<sub>3</sub>-Pro (I)

(式中、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、Xn<sub>1</sub>、Xn<sub>2</sub>、およびXn<sub>3</sub>はそれぞれ独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す)からなるアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド。

【請求項2】 下記(a)または(b)に記載のポリペプチド。

(a) 配列番号: 5~8、10、12、13、21~24、26~29、32、33、37~40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) 配列番号: 5~8、10、12、13、21~24、26~29、32、33、37~40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド。

【請求項3】 神経細胞死の抑制のために用いる、請求項1または2に記載のポリペプチド。

【請求項4】 請求項1から3のいずれかに記載のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチド。

【請求項5】 請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項6】 請求項5に記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項8】 請求項7に記載の宿主細胞を培養し、発現させたポリペプチドを該宿主細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項9】 請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドを神経細胞に接触させる工程を含む、神経細胞死を抑制する方法。

【請求項10】 請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドまたは請求項6に記載のベクターを有効成分とする医薬組成物。

【請求項11】 神経細胞死抑制剤である、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項12】 神経変性を伴う疾病的予防または治療に用いられる、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項13】 アルツハイマー病の予防または治療に用いられる、請求項10に記載の医薬組成物。

【請求項14】 請求項1から3のいずれかに記載のポリペプチドに結合する抗体。

【請求項15】 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNAの検出または操作に用いられるDNA

【請求項16】 請求項1から4のいずれかに記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、
- (b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、
- (c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は現在最も精力的に研究されている神経変性疾患であり、臨床的には進行性の記憶喪失および認知障害、病理学的には広範囲の神経喪失、神経細胞内集積物 (intraneuronal tangles)、およびコンゴーレッドに高親和性の核 (cognophilic dence core) を持つ細胞外老人斑により特徴付けられる。ADに対する効果的な治療方法は未だ存在しない。進行性の神経細胞死により、この疾患の臨床発現の全てではないにしろ、その多くを説明できることが一般に受け入れられており、ADにおける神経細胞死発症の病理機構を解明し、これを防ぐことは、これまでにない有効なAD治療法を確立するためには必須である。

## 【0003】

早発性の家族性AD (FAD) を引き起こす既知の変異遺伝子としては、4種の異なるグループ: V642I/F/G APP (数字は695アミノ酸を持つAPPであるAPP<sub>695</sub>のもの)、KM595/596NL APP (NL-APP)、プレセニリン(PS)-1変異体、およびPS-2変異体が存在する (Shastry, B.S. and Giblin, F.J. (1999) *Brain Res. Bull.* 48, 121-127)。Yamatsujiらは、APPの3つのV642型変異 cDNA を神経細胞株 F11 に一過的に発現させた時の観察に基づき、これらのFAD遺伝子群が、神経細胞の細胞死を引き起こし得ることを示唆した (Yamatsuji, T. et al. (1996) *Science* 272, 1349-1352)。この観察は、初代培養神経や他の神経細胞株を用いた実験によっても確認された (Zhao, B. et al. (1997) *J. Neurosci. Res.* 47, 253-263; Luo, J. J. et al. (1999) *J. Neurosci. Res.* 55, 629-42)。また、Wolozinらは、FAD関連変異 N141I PS-2 が PC12 細胞において有意に細胞死の比率を高めること、そしてFAD関連変異 PS-1 が T リンパ球のアポトーシスを誘導することを見出した (Wolozin, B. et al. (1996) *Science* 274, 1710-1713; Wolozin, B. et al. (1998) *Neurobiol. Aging* 19, S23-27)。さらに、PS-1についても、A<sub>β</sub> 添加や栄養因子 (trophic factor) の欠乏により誘導される神経細胞死の感受性が、PS-1変異体の発現により上昇すること (Guo, Q. et al. (1996) *Neuroreport* 8, 379-83; Zhang, Z. et al. (1998) *Nature* 395, 698-702; Guo, Q. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4125-30)、また、野生型 PS-1を過剰発現するトランスジェニックラットに由来する培養皮質神経は、非ト

ランスジェニックのコントロールに比べ、栄養因子欠乏による細胞死に対する感受性が高まる (Czech, C. et al. (1998) *Neuroscience* 87, 325-36) ことなどが繰り返し観察されている。変異PS-1 が神経細胞死の刺激因子であるのか、または神経細胞死に対し効果を持たないのかについては議論の余地が残されているものの (Weihl, C. C. et al. (1999) *J. Neurosci.* 19, 5360-9; Bursztajn, S. et al. (1998) *J. Neurosci.* 18, 9790-9)、既知の4種のFAD遺伝子 (V642型変異APP、NL-APP、PS-1変異体、およびPS-2変異体) の全てが、神経細胞死を誘導するか、または特定の条件下で他の細胞死刺激に対する神経細胞の傷害性を増強させている可能性が高い。ゆえに、AD治療法の開発に最も重要な鍵は、神経細胞で観察されるAD遺伝子により誘導される細胞死を抑制できる分子を探し出すことであると考えられる。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドおよびその利用を提供することを課題とする。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者はこれまでに、家族性アルツハイマー病型変異 V642I アミロイド前駆体蛋白質 (V642I APP) を誘導的に発現する神経細胞系 (F11/EcR/V642I) を確立している (国際公開番号 WO00/14204参照)。この系では、V642I APPが F11神経細胞においてエクダイソン処理に応答して発現する。F11/EcR/V642I 細胞をエクダイソンと2~3日インキュベートすることにより、ほぼ全ての細胞が細胞死を起こすが、対照のインキュベーションではごく少数の細胞が細胞死を起こすに過ぎない。本発明者は、このF11/EcR/V642I 細胞を、V642I APPにより誘導される神経細胞に対するアンタゴニストとして作用する遺伝子の検索に利用した。

#### 【0006】

すなわち、アルツハイマー病 (AD) 患者脳より発現cDNAライブラリーを構築し、これを上記 F11/EcR/V642I 細胞にトランスフェクションして、V642I APP による神経細胞死から生き残った細胞を選択するデストラップ法によるスクリーニ

ング操作を繰り返し行った。その結果、本発明者は、V642I APP による神経細胞死を保護する新規な遺伝子を同定することに成功した。Humanin (HN) cDNAと名づけられたこのクローンは、新規な24アミノ酸のポリペプチドをコードしており、ADに関連する神経細胞死、すなわち、既知の全てのタイプの早発型家族性AD遺伝子 [V642I APP、KM595/596NL APP、M146L プレセニリン(PS)-1、および N141I PS-2] および $\text{A}\beta$  1-43により誘導される神経細胞死を抑制することが判明した。これに対し、ハンチントン病 (HD) / 脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) に関連したポリグルタミンリピート Q79 や、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキサイドディスクターゼ (Cu/Zn-dependent superoxide dismutase; SOD1) 変異体による神経毒性に対しては効果を示さなかった。HN mRNA は中枢神経系以外の幾つかの器官で主に産生されていた。HN cDNAを神経細胞にトランスフェクションしたところ、転写され予想されるペプチドが産生された後、培養液中に分泌され約 $10 \mu\text{M}$ のレベルに達した。この培養上清には、V642I APPによる神経細胞死からの有意な保護を示すのに十分な活性が含まれていた。合成 HN ポリペプチドもまた、同様の用量-応答特性で4種のAD遺伝子に対する神経保護作用を示し、 $1\sim10 \mu\text{M}$ でその抑制は最大となった。分泌能を欠損させたHN誘導体をコードするcDNAを神経細胞で発現させたところ、細胞内で発現されたポリペプチドは細胞死を保護することができなかったが、同じポリペプチドを合成して培養液に添加した場合は保護作用を示したことから、HNポリペプチドは細胞の外側から作用することが判明した。ポリペプチドの構造を変えて活性を試験した結果、8番目のCysと14番目のSerが重要であることが判明した。C8Aの置換はレスキュー活性を完全に欠損させ、S14Gの置換はレスキュー活性を顕著に増加させた。S14G HN ポリペプチド (HNG) は、低nM (1~10nM) で、4種すべてのFAD遺伝子からの完全な保護作用を示した。HNの抗AD活性は初代培養皮質神経においても観察され、HNにおいては $\mu\text{M}$ レベルで、またS14G誘導体 (HNG) においてはnMレベルで、 $\text{A}\beta$  が引き起こす細胞死および細胞傷害を保護したが、C8A (HNA) にはその活性は見られなかった。さらに、詳細な構造/機能関係を解析した結果、3番目のProから19番目のProまでが神経保護機能にとって重要であり、その中でも活性に本質的な7残基を特

定するに至った。また、S14G HN ポリペプチドに2アミノ酸の変異を導入した結果、神経保護作用をさらに高めることに成功した。これらの知見を基に、より活性が高く生体投与に適したポリペプチドを開発することが可能である。これらのポリペプチドは、ADの治療薬開発に新たな道を開くと共に、神経細胞死からの保護を目的とするAD治療方法の開発に大きく貢献すると考えられる。

## 【0007】

本発明は、ADに関連する神経細胞死から細胞を保護する新規なポリペプチドおよびその利用に関し、より具体的には、

## (1) 式 (I)

Pro-Xn<sub>1</sub>-Cys-(Leu/Arg)-Xn<sub>2</sub>-Leu-Thr-(Gly/Ser)-Xn<sub>3</sub>-Pro (I)

(式中、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、Xn<sub>1</sub>、Xn<sub>2</sub>、およびXn<sub>3</sub>はそれぞれ独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す)からなるアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド、

## (2) 下記 (a) または (b) に記載のポリペプチド、

(a) 配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチド、

(3) 神経細胞死の抑制のために用いる、(1) または (2) に記載のポリペプチド、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチド、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA、

(6) (5) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(7) (6) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(8) (7) に記載の宿主細胞を培養し、発現させたポリペプチドを該宿主細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドの製造方法、

(9) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドを神経細胞に接触させる工程を含む、神経細胞死を抑制する方法、

(10) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドまたは (6) に記載のベクターを有効成分とする医薬組成物、

(11) 神経細胞死抑制剤である、(10) に記載の医薬組成物、

(12) 神経変性を伴う疾病的予防または治療に用いられる、(10) に記載の医薬組成物、

(13) アルツハイマー病の予防または治療に用いられる、(10) に記載の医薬組成物、

(14) (1) から (3) のいずれかに記載のポリペプチドに結合する抗体、

(15) 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、(1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドをコードするDNA の検出または操作に用いられるDNA、

(16) (1) から (4) のいずれかに記載のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 該ポリペプチドに被検試料を接触させる工程、
- (b) 該ポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、
- (c) 該ポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、に関する。

## 【0008】

本発明においてポリペプチドとは2またはそれ以上のアミノ酸またはアミノ酸誘導体が結合したペプチドまたは蛋白質を指す。ポリペプチドにはペプチドイソステア (peptide isosteres) が含まれてもよい。ポリペプチドは、通常、ペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーなどと呼ばれるような短い鎖も含まれる。また、蛋白質と呼ばれるような、長い鎖も含む。ポリペプチドは、翻訳後修

飾などにより天然に修飾されていてもよい。また人工的に修飾されていてもよい。修飾には、ペプチドのバックボーン、アミノ酸側鎖、アミノ末端、またはカルボキシル末端などの修飾が含まれる。また、ポリペプチドは分岐していてもよく、環状でもよい。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、[ フラビン (flavin) 、ヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、脂質、脂質誘導体、またはホスファチジルイノシトール ] 等の共有結合、クロスリンク形成、環状化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、ピログルタミン酸化、 $\gamma$ -カルボキシル化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、メチル化、ミリストイル化、酸化、リン酸化、ユピキチン化などが含まれる。

## 【0009】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、アルツハイマー病に関連する細胞死から神経細胞を保護するポリペプチドを提供する。本発明者が単離した、Humanin (HN) ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：5に、該ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームのcDNA配列を配列番号：4に示す。Humanin は、ADに関連する神経細胞死をアンタゴナイズする活性を有しており、約10  $\mu$ Mの濃度で飽和活性を示す。また、Humanin のアミノ酸置換体である HNG (S14G) (配列番号：8) は、Humanin に比べ 100~1000倍高いアンタゴナイズ効果を示した。さらに、HNGの誘導体である AGA-HNG (配列番号：42) は HNG よりも数倍高い活性を示した。本発明のポリペプチドには、Humanin、HNG、および AGA-HNG が含まれる。

## 【0010】

また、本発明により、Humanin のC末に FLAG タグ (DYKDDDDK) を付加しても、神経保護作用に影響を与えないことが示された (実施例3)。さらに、Humanin のC末 4アミノ酸 (KRRA) を他のアミノ酸に置換しても、元々の Humanin と同等の神経保護作用を有していた (実施例6)。これらの事実は、Humanin、HNG、または AGA-HNG のアミノ酸配列に変異を導入することによって、これらと同等またはそれ以上の神経保護作用を有するポリペプチドを作製できることを証明している。

## 【0011】

本発明者は Humanin の欠失変異体を用いたさらに詳細な解析を行い、Humanin の3番目～19番目からなる17アミノ酸のポリペプチド (HN-17, 配列番号 : 21) でも、神経に対する防御活性を示すのに十分であることを見出した (実施例 1 3)。さらに、HNG の3番目のProから19番目のProからなるポリペプチド (HNG-17, 配列番号 : 24) の各アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換して、その神経細胞死抑制活性を検証したところ、活性を維持したまま半数以上のアミノ酸残基が置換可能であった。この実験により、HNG-17中で神経細胞死の抑制に本質的なアミノ酸は、1番目のPro、6位のCys、7番目のLeu、10～12番目の Leu-Thr-Gly、17番目のProの7アミノ酸であることが判明した。従って、これらの残基を維持したまま、他の残基を置換、欠失、および／または挿入等により改変することによりさらにアミノ酸配列を持つ異なるポリペプチドを作製することも可能である。

#### 【0012】

重要なのは、活性に本質的な上記の7アミノ酸でさえも、他のアミノ酸に置換可能であることである。例えば、HNG-17の12番目のGlyはSerであっても (すなわちHN-17)、神経防御活性は失われない。また、7番目のLeuに相当する部位がArgに置換されている合成ポリペプチド (HNR; 配列番号 : 7) は、合成HNと同等の神経防御活性を示した (実施例 1 2)。これらの事実から、本実施例で活性の検出されたポリペプチドのアミノ酸において、活性に非本質的および／または本質的なアミノ酸の変異により、これらのポリペプチドと同等またはそれ以上の神経細胞死抑制活性を有するポリペプチドを作製することも可能であると考えられる。

#### 【0013】

本発明のポリペプチドは、式 (I)

$$\text{Pro-Xn}_1\text{-Cys-(Leu/Arg)-Xn}_2\text{-Leu-Thr-(Gly/Ser)-Xn}_3\text{-Pro} \quad (I)$$

からなるアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病 (AD) に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチドが含まれる。式中、「(Leu/Arg)」はLeuまたはArg、「(Gly/Ser)」はGlyまたはSerであり、Xn<sub>1</sub>、Xn<sub>2</sub>、およびXn<sub>3</sub>はそれぞれ独立に10残基以下の任意のアミノ酸を表す。好ましくは、Xn<sub>1</sub>、Xn<sub>2</sub>、およびXn<sub>3</sub>はそれぞれ独立に 2～6、0～4、および 2～6 残基の任意のアミノ酸、より好ま

しくはそれぞれ独立に3~5、1~3、および3~5残基の任意のアミノ酸、最も好ましくはそれぞれ独立に4、2、および4残基の任意のアミノ酸である。6残基程度の付加されたアミノ酸は $\alpha$ ヘリックスを形成しアミノ酸1残基のように振舞うことがある。本発明のポリペプチドとしては、4残基、2残基、および4残基の任意のアミノ酸からなる $Xn_1$ 、 $Xn_2$ 、および $Xn_3$ のいずれかまたは全てに、6残基またはそれ以下の任意のアミノ酸が付加されたポリペプチドであってもよい。

このようなポリペプチドは、公知のペプチド合成技術により製造することが可能であり、また、これらポリペプチドをコードするDNAを発現させることによっても製造することが可能である。

## 【0014】

$Xn_1$ の配列としては、好ましくは、例えば(Arg/Ala)-(Gly/Ala)-(Phe/Ala)-(Ser/Ala)からなる配列およびこれらの配列に保存的置換が加えられた配列が含まれる。ここで、例えば「Arg/Ala」はArgまたはAlaであることを示す(他も同様)。保存的置換としては、下記のアミノ酸のグループ内の置換などが挙げられる。このような配列としては、Arg-Gly-Phe-Ser、Ala-Gly-Phe-Ser、Arg-Ala-Phe-Ser、Arg-Gly-Ala-Ser、またはArg-Gly-Phe-Alaなどが挙げられる。また、 $Xn_2$

の配列としては、好ましくは、例えば(Leu/Ala)-(Leu/Ala)からなる配列およびこれらの配列に保存的置換が加えられた配列が含まれる。このような配列としては、Leu-Leu、Ala-Leu、Leu-Alaなどが挙げられる。また、 $Xn_3$ の配列としては、好ましくは、例えば(Glu/Ala)-(Ile/Ala)-(Asp/Ala)-(Leu/Ala)からなる配列およびこれらの配列に保存的置換が加えられた配列が含まれる。このような配列としては、Glu-Ile-Asp-Leu、Ala-Ile-Asp-Leu、Glu-Ala-Asp-Leu、Glu-Ile-Ala-Leu、Glu-Ile-Asp-Alaなどが挙げられる。 $Xn_1$ 、 $Xn_2$ 、および $Xn_3$ の配列は任意の組み合わせで選択し得る。

## 【0015】

ADに関連する神経細胞死は、株化神経細胞(例えばF11細胞)や初代神経培養(例えばラット脳皮質初代培養)におけるAPP、PS-1、またはPS-2の変異体(例えばV642I/F/G APP、NL-APP、M146L PS-1、およびN141I PS-2)の発現により引き起こされる他、初代神経培養への $\text{A}\beta$ (例えば $\text{A}\beta$ 1-43)の添加によって

も引き起こされる。本発明のポリペプチドには、これらのADに関連する神経細胞死の少なくともいずれかを抑制する活性を有しているものが含まれる。細胞死の抑制は、完全な抑制ではなくても、有意に抑制されればよい。神経細胞死の抑制活性は、実施例に記載された方法または他に記載の方法（例えば国際公開番号 WO00/14204参照）に従って検定することができる。

## 【0016】

具体的な方法を例示すれば、例えば V642I/F/G APP、NL-APP、M146L PS-1、または N141I PS-2などのFAD遺伝子を発現するベクターを単独で、または検定したいポリペプチドを発現するベクターと共に神経細胞（例えばF11細胞）にトランスフェクトし、一定時間（例えば72時間）培養後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定する。または、検定したいポリペプチドを予め調製しておき、このポリペプチドの存在下または非存在下で細胞にFAD遺伝子をトランスフェクトして、細胞死を測定してもよい。FAD遺伝子は、誘導性プロモーターを用いてコンディショナルに発現させることもできる。検定したいポリペプチドの非存在下で誘導される細胞死に対して、ポリペプチド存在下における細胞死が有意に低下すれば、このポリペプチドはADに関連する神経細胞死を抑制する活性を有すると判定される。細胞としては、他に初代培養神経などを用いてもよいし、細胞死の誘導はA $\beta$ の添加などで行ってもよい。また、細胞死の測定はトリパンブルー排除以外にも、形態変化、LDH放出、またはアポトーシス（核の形態変化またはDNA断片化など）の測定によって行うことも可能である。

## 【0017】

本発明のポリペプチドは、また、配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、および該ポリペプチドにおいて、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を含み、アルツハイマー病（AD）に関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチドが含まれる。

## 【0018】

変異させるアミノ酸残基数に特に制限はないが、置換、欠失、および／または

挿入によりアミノ酸配列を改変する場合は、その数は通常、15残基以内のアミノ酸、より好ましくは12以内、さらに好ましくは10以内、さらに好ましくは8以内（例えば5個以内）であると考えられる。付加されるアミノ酸は、ADに関連する神経細胞死を抑制する活性が保持される限り制限はない。アミノ酸の置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列は、人為的に作出したものであってもよく、また自然に生じたポリペプチドの配列であってもよい。

## 【0019】

アミノ酸を人為的に置換する場合、性質の似たアミノ酸に置換すれば、もとのポリペプチドの活性が維持されやすいと考えられる。本発明のポリペプチドは、配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、および42からなる群より選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのアミノ酸に保存的置換が加えられたポリペプチドであって、ADに関連する神経細胞死を抑制する活性を有するポリペプチドが含まれる。保存的置換は、神経細胞死抑制に本質的なアミノ酸（例えば HNG-17 において本質的な上記7アミノ酸）を置換する場合などにおいても重要であると考えられる。このようなアミノ酸の保存的置換は、当業者にはよく知られている。保存的置換に相当するアミノ酸のグループとしては、例えば、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 $\beta$  分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トサプロトファン、ヒスチジン）などが挙げられる。また、非保存的置換によりポリペプチドの神経細胞死抑制活性、安定性、組織移行性などをより上昇または下降させることも考えられる。

## 【0020】

本発明のポリペプチドは、公知のペプチド合成技術によって合成ポリペプチドとして製造することができる（日本生化学会編、新生化学実験講座 タンパク質V

I, pp.3-74, 東京化学同人, 1992年)。ペプチドの合成法は、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。また、合成DNAの作製や部位特異的変異導入法などにより Humanin cDNA (例えば配列番号: 4) に変異を導入し、これを宿主細胞で発現させて、任意のアミノ酸変異を有するポリペプチドを調製することも可能である。改変されるアミノ酸の数や位置は、得られるポリペプチドがADに関連する神経細胞死を抑制する活性を有する限り制限はない。

## 【0021】

本発明のポリペプチドは、そのアミノ酸残基数に特に制限はないが、例えば医薬組成物として使用する場合においては、一般に分子サイズが小さい方が好ましい。活性に必要のない部分 (例えばアミノ酸残基または官能基) を持たないことは、抗原性を低下させ、他の分子との非特異的な相互作用を回避できることから、好ましくない副作用を低減させる効果も期待できる。本発明のポリペプチドは、好ましくはアミノ酸500残基以内、より好ましくは100残基以内、より好ましくは50残基以内、さらに好ましくは30残基以内である。平均分子量としては、好ましくは60kDa以内、より好ましくは15kDa以内、より好ましくは6kDa以内、さらに好ましくは4kDa以内である。

## 【0022】

本発明は、また、上記本発明のポリペプチドと他のポリペプチドとの融合ポリペプチドに関する。融合ポリペプチドとは、天然において隣接していない少なくとも2つのポリペプチドが連結したポリペプチドであり、ペプチド合成により、またはポリペプチドのコード領域をフレームが一致するように連結させた核酸を発現させることにより製造することができる。他のポリペプチドとしてはタグのような数残基の短いペプチドから蛋白質のような長いポリペプチドまで任意のポリペプチドが挙げられる。具体的には、Hisタグ、HAタグ、GFP、マルトース結合蛋白質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) などが挙げられる。また、リーダー配列、分泌シグナル、プレ蛋白質またはプロ蛋白質の配列などが挙げられる、それらに制限されない。本発明のポリペプチドを有効に脳血液関門を通過せしめるために、これを容易にする一群のポリペプチドを融合することもできる。

## 【0023】

また、本発明のポリペプチドには、その塩も含まれる。このような塩は酸または塩基から誘導される。具体的には、例えば無機酸との塩（例えば、塩酸塩、リン酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩など）、有機酸との塩（例えば、酢酸塩、乳酸塩、ギ酸塩、酪酸塩、グリコール酸塩、プロピオン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、リンゴ酸塩、シウ酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩など）、あるいは塩基との塩（例えば、アンモニウム塩、ナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩およびマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、有機塩基との塩、およびアルギニンやリジンなどのアミノ酸との塩）が挙げられる。

## 【0024】

また、本発明のポリペプチドには、その誘導体が含まれる。ここで「誘導体」とは、本発明のポリペプチドの官能基を既知の方法により修飾、付加、変異、置換、または削除などにより改変された形態を持つ分子を意味する。このような官能基の改変は、例えば、ポリペプチドに存在する官能基の保護、ポリペプチドの安定性または組織移行性の制御、あるいはポリペプチドの活性の制御等を目的として行われる。例えば、本発明のポリペプチドには、そのN末端、C末端、及びポリペプチドを構成するアミノ酸の側鎖の官能基のいずれかが保護基等の他の置換基によって修飾されているものが含まれる。置換基としては、例えば各種のアルキル基、アシル基、アミド体、リン酸基、アミノ基、カルボキシル基、エステル基など挙げられるがこれらに制限されない。

また、本発明のポリペプチドには、ポリペプチド同士を結合させたダイマーなどの重合体、分枝状分子、環化分子が含まれる。また、ポリペプチドは担体に結合していくてもよい。

## 【0025】

本発明のポリペプチドを構成するアミノ酸は、L体および/またはD体であることができる。D体のアミノ酸の使用は、ペプチダーゼによる分解を低下させるために有用である。また、アミノ酸は天然のアミノ酸に限定されず、非天然のアミノ酸でもよい。例えば、ホモセリン、 $\beta$ -ヒドロキシバリン、0-4-ヒドロキシフ

エニルチロシン、 $\alpha$ -t-ブチルグリシン、2-アミノ酪酸、 $\alpha$ -シクロヘキシルグリシン、 $\alpha$ -フェニルグリシンなどをあげることができる。また、ポリペプチドのペプチド結合は、適宜ペプチド結合以外の共有結合に置換することができる。非ペプチド結合への置換により、ペプチダーゼによる感受性を下げ、薬効の持続性の向上や投与ルートの選択の幅を広げることができる。非ペプチド結合の例としては、イミノ結合、エステル結合、ヒドラジン結合、セミカルバジド結合、およびアゾ結合などが挙げられるが、これらに制限はない。

また、本発明のポリペプチドの構造を模倣する化合物を設計することも考えられる。例えば、本発明のポリペプチドの構造に関する物理的および化学的性質を、活性部位修飾手法、NMR、X線結晶解析を含む公知の手法によって解析し、これを基にポリペプチドの神経保護作用に重要な物理的および化学的機能のマップを作成する。この機能を模擬した分子を設計し合成する。また、本発明のポリペプチドは、その活性の高さから受容体に結合すると考えられるが、同受容体に結合する化合物を設計することも考えられる。このように誘導された分子が神経保護作用を有するか否かは、実施例に記載の方法に従ってアッセイすることができる。

#### 【0026】

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするDNAを提供する。本発明のDNAの由来は特に制限されず、合成DNA、ゲノムDNA、cDNAなどが含まれる。本発明のDNAには、配列番号：4で示されるHumaninをコードするcDNAが含まれる。また、配列番号：5～8、10、12、13、21～24、26～29、32、33、37～40、または42に記載のアミノ酸をコードする任意の縮重に基づく塩基配列を有するDNAが含まれる。また、本発明のDNAは、コード領域以外に、5'および3'に非コード配列（非転写配列、非翻訳配列、スプライシング配列、ポリA付加配列、IRES、mRNA安定化・不安定化配列等を含む）を含んでもよい。

本発明のDNAは、ベクターに挿入して本発明のポリペプチドの生産に利用することができる他、後述するように遺伝子治療目的に利用することができる。

#### 【0027】

本発明のポリペプチドの產生のために用いられる宿主に特に制限はなく、大腸

菌、酵母、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞などの細胞または個体を用いることができる。宿主-ベクター系としては、例えば、バキュロウイルス-Sf細胞系 (Okamoto et al., J. Biol. Chem. 270: 4205-4208, 1995)、pcDNA-CHO細胞系 (Takahashi et al., J. Biol. Chem. 270: 19041-19045, 1995)、および CMV プロモータープラスミド-COS細胞系 (Yamatsuji et al., EMBO J. 15: 498-509, 1996) などが挙げられるが、これらに制限されない。

## 【0028】

本発明のポリペプチドは、宿主細胞から分泌させうる。実施例で示されるように、Humanin および HNG 等は、発現させた細胞から細胞外に分泌され、分泌されたポリペプチドは神経細胞死をアンタゴナイズする活性を示した。細胞外に分泌させた場合には、本発明のポリペプチドは宿主細胞の培養上清から簡便に回収することが可能である。

## 【0029】

本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAは、神経細胞死を抑制するための試薬とすることができます。DNAは適宜ベクターに組み込み、該ベクターを試薬することができる。本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAを含む試薬は、ポリペプチドやDNA自体を試薬として用いる他、滅菌水、生理食塩水、緩衝剤、塩、安定剤、保存剤、界面活性剤、他の蛋白質 (BSAなど)、トランスフェクション試薬 (リポフェクション試薬を含む) 等と適宜組み合わせてもよい。これらは混ぜ合わさっていてもよく、使用時に混合されるまで分離されていてもよい。

## 【0030】

本発明のポリペプチドを神経細胞に接触させることによって、神経の細胞死を抑制することができる。このとき、本発明のポリペプチドを細胞の外側から接触させる。例えば、細胞培養系であれば、培養液にポリペプチドを添加すればよい。*in vivo* で使用する場合は、細胞死の抑制の標的となる細胞にポリペプチドが接触し得るようにポリペプチドを投与すればよい。ポリペプチドの濃度は神経細胞死抑制活性の強弱や使用目的にもよるが、例えばHNと同等の活性を有するポリペプチドであれば約10  $\mu$ Mまたはそれより低い濃度で、HNGと同等の活性を有する

ポリペプチドであれば、約10nMまたはそれより低い濃度で最大の活性を示す。ポリペプチドが分泌性であるならば、細胞内に導入または発現しても、ポリペプチドが細胞外に分泌され、細胞死を抑制することができる。このためには、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAを細胞内で発現させればよい。本発明のポリペプチドを発現するベクターを細胞に導入することにより、細胞培養系または *in vivo* において神経細胞の細胞死を抑制することができる。また、分泌性の本発明のポリペプチドを発現する細胞との共培養、または *ex vivo* 投与などにより、周囲の細胞の細胞死を抑制することも可能である。

## 【0031】

本発明は、また、本発明のポリペプチド、または本発明のポリペプチドをコードするDNAが挿入されたベクターを有効成分とする医薬組成物を提供する。本発明のポリペプチドは、細胞に外から加えることにより、または分泌性のポリペプチドを細胞内で発現させることにより、神経変性を保護することができる。従って、本発明のポリペプチドは、特に神経変性を伴う疾患に対する医薬組成物として有用である。

## 【0032】

実施例に示されるように、化学合成された Humanin (HN) ポリペプチドは、細胞外液の濃度が約10nM以上で神経細胞死を抑制する活性を示し、1~10  $\mu$ Mの濃度で最大の抑制活性を示した。また、HNGおよびAGA-HNG ポリペプチドは、約1nMで有意または十分な神経保護作用を示した。この神経保護作用は、これらのポリペプチドをコードするDNAを細胞へ導入して発現させることによってもたらされる。従って、本発明のポリペプチドを発現するベクターを医薬として用いて、~~遺伝子治療などを行うことも可能であると考えられる。遺伝子治療に用いる場合は、分泌型のポリペプチド、または分泌シグナルを付加したポリペプチドを発現させることもできる。ベクターの投与方法は、*in vivo* であっても *ex vivo* であってもよい。遺伝子治療に用いるためのベクター系としては、アデノウイルスベクター、AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクター、ヘルペスウイルスベクター (いずれも Robbins and Ghivizzani, Pharmacol. Ther. 80: 35-47, 1998) 、レトロウイルスベクター (Engel and Kohn, Front. Biosci. 4: e26-33, 1999) 、~~

レンチウイルスベクター (Lundstrom, K., 1999, J. Recept. Signal. Transduc. Res. 19: 673-686) などを用いることが考えられるが、これらに制限されない。

## 【0033】

本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドを発現するベクターを利用して予防や治療を行なう対象となる疾患としては、本発明のポリペプチドが疾患の治療に有効である限り、特に制限されない。好適な対象疾患としては、神経関連疾患、特にアルツハイマー病が挙げられる。これまでの研究からアルツハイマー病において神経細胞の細胞死が起こることが明らかにされている (I. Nishimoto et al., 1997, Adv. Pharmacol., 41: 337-368)。この細胞死には、APP (I. Nishimoto et al., 1998, Neurobiol. Aging., 19: S33-S38) やプレセニリン (Nishimura et al., 1999, Clin. Genet. 55: 219-225) のある種の活性化が関与していることが示唆されている。このため、本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病における神経変性を保護する薬剤として用いられることが期待される。また、本発明の医薬組成物を用いて、アルツハイマー病以外にも、例えば脳虚血による神経細胞の細胞死に起因する疾患を予防することも可能である (T. Kirino, 1982, Brain Res., 239: 57-69)。その他、痴呆を伴うパーキンソン病 (M.H. Polymopoulos et al., 1997, Science, 276: 2045-2047)、びまん性レーピー小体 (Lewy bodies) 病 (M.G. Spillantini et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6469-6473)、ダウン症に伴う痴呆なども、治療や予防の対象となる。また、APPの類縁分子である APLP1 が、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子といわれている (Lenkkeri, U. et al., 1998, Hum. Genet. 102: 192-196) ことから、ネフローゼ症候群などの腎疾患も治療や予防の対象となる。

## 【0034】

本発明の医薬組成物は、有効成分自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化することも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、徐放剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。本発明の医薬組成物は、水溶液、錠剤、カプセル、トローチ、バッ

カル錠、エリキシル、懸濁液、シロップ、点鼻液、または吸入液などの形態であり得る。ポリペプチドの含有率は適宜決定すればよい。

## 【0035】

患者への投与は、有効成分の性質に応じて、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、脊髄腔内、脳室内、または経口的に行われうるがそれらに限定されない。脳神経変性疾患の治療に用いる場合においては、本発明の医薬組成物は、静脈内、脊髄腔内、脳室内または硬膜内注射を含む任意の適当な経路で中枢神経系に導入するのが望ましい。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。投与量、投与方法は、本発明の医薬組成物の有効成分の組織移行性、治療目的、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

## 【0036】

例えば、アルツハイマー病治療などにおいて、脳神経細胞の変性保護を目的とした投与を行う場合には、本発明のポリペプチドが標的とする細胞周囲において神経変性を有效地に抑制する濃度となるように投与されることが好ましい。すなわち、Humaninポリペプチドまたはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも 1nM以上、好ましくは 10nM以上、より好ましくは 100nM以上、より好ましくは 1μM以上となるように投与されるべきである。HNGまたはこれと同等の神経細胞死保護作用を有するものであれば、少なくとも 1pM以上、好ましくは 10pM以上、より好ましくは 100pM以上、より好ましくは 1nM以上となるように投与されるべきである。また AGA-HNG であれば、HNGの数分の一から十分の一の濃度で同等の効果を期待できる。これらを達成するための投与量は、投与経路によって適宜決定することが可能である。

## 【0037】

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。本発明の抗体には、ポリクーナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。ポリクローナル抗体は、例えば HN やHNGなどの本発明のポリペプチド、またはそれらの部分ペプチドを調製し、これを抗原にウサギ、ヤギ、ヒツジなどを免疫してポリク

ローナル抗体を作製する。抗原ペプチドは、適宜他のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニンやアルブミンなどのキャリア蛋白質に結合させて免疫することができる。モノクローナル抗体は、免疫したマウスやラットの脾細胞を用い、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることにより作製することができる。抗体の作製は、公知の方法に従って行うことができる (Ed. Harlow and David Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。

ポリクローナル抗体は血清から、モノクローナル抗体ではハイブリドーマ培養上清またはハイブリドーマを接種した動物の腹水から硫安分画、プロテインGセファロースカラム、抗原を固定したアフィニティーカラムなどの一般的な生化学的手法で抗体を精製することができる。

これにより調製された抗体は、本発明のポリペプチドの吸収のために用いられる他、例えば、本発明のポリペプチドの構造変異の検査や診断、本発明のポリペプチドの発現量の検出などに利用することができる。

#### 【0038】

Humanin もしくは Humanin 様ペプチドの血中または神経組織を含む組織内濃度の低下が、ADを含む神経またはその他の臓器変性疾患の診断または予後判定に用いることができる可能性がある。例えば同じAD患者でも、血中のHN活性の低い人は、高い人に比べ病気の進行が急速で、予後が不良である可能性が考えられる。検査方法としては、例えば抗 Humanin 抗体を用いたRIA法により、血液または組織サンプル中の濃度を測定したり、生検材料を免疫組織染色法で検査することが考えられる。また、例えば本発明のポリペプチドの投与による治療の際に、ポリペプチドレベルをモニタ~~すること~~も考えられる。

#### 【0039】

本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片であってもよい。例えば、 $\text{Fab}$ 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 $\text{Fv}$ 、またはそれらの修飾物が含まれる。また、ヒト型抗体もしくはヒト抗体なども含まれる。

#### 【0040】

本発明はまた、Humanin をコードするDNA（配列番号：4）またはその相補鎖

に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含む、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の検出または操作に用いられるDNAを提供する。「遺伝子の検出または操作」には、遺伝子発現の検出、および発現制御が含まれる。ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、70%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば95%以上）の塩基配列上の同一性を有すればよい。配列の同一性は、例えば文献「Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410」に記載の方法に従って決定することができる。

## 【0041】

このようなDNAには、本発明のペプチドをコードするDNAやRNAの検出や增幅に用いるプローブやプライマー、本発明のポリペプチドの発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムをコードするDNA等）が含まれる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域を相補的にして、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

## 【0042】

また、本発明は、本発明のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。このようなスクリーニングは、（a）本発明のポリペプチドに被検試料を接触させる工程、（b）本発明のポリペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および（c）本発明のポリペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法により実施することが可能である。

## 【0043】

本発明のポリペプチドは、スクリーニングの手法に応じて、可溶性ポリペプチドとして、また担体に結合させた形態としてスクリーニングに用いることができる。本発明のポリペプチドは標識されていてもよい。標識としては、放射性同位元素による標識、蛍光物質による標識、ビオチンやジゴキシゲニンによる標識、タグ配列の付加などが挙げられる。

## 【0044】

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質（抗体を含む）、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、土壌などの天然材料、放線菌プロースなどの細菌放出物質を含む溶液などが挙げられるが、これらに制限されない。被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

## 【0045】

例えば、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質をスクリーニングする場合は、本発明のポリペプチドを固定したアフィニティーカラムに本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される組織または細胞の細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより、本発明のポリペプチドに結合するタンパク質のスクリーニングを実施することが可能である。

## 【0046】

さらに、本発明のポリペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される組織若しくは細胞（例えば脳皮質組織、またはF11などの神経細胞）よりファージベクターを用いたcDNAライブラリーを作製し、アガロース上にブラークを形成させ、標識した本発明のポリペプチドを用いてウエストウエスタンブロッティング法によりスクリーニングしたり、GAL4 DNA結合領域などのDNA結合ペプチドおよびGAL4転写活性化領域などの転写活性化ペプチドを、それぞれ本発明のポリペプチドおよび被検タンパク質との融合タンパク質として発現させ、DNA結合ペプチドの結合配列を有するプロモーターの下流に連結させたレポーター遺伝子の発現を通して本発明のタンパク質と被検タンパク質との結合を検出する「twoハイブリッドシステム」等に従い実施することも可能である。

## 【0047】

本発明のスクリーニングにより、本発明のポリペプチドに対する受容体をクローニングすることも考えられる。この場合、被検試料は受容体を発現していることが予想される組織または細胞、例えば脳皮質組織、神経細胞株、または神経芽細胞腫や奇形腫細胞などから調製することが好ましい。神経細胞株としては、例え

ば F11細胞、PC12細胞(L.A. GreeneおよびA.S. Tischler, 1976, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 73: 2424-2428)、NTERA2細胞(J. SkowronskiおよびM. F. Singer, 1985, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 82: 6050-6054)、SH-SY5Y細胞(L. Odelstad et al., 1981, Brain Res., 224: 69-82)等が挙げられる。

## 【0048】

また、固定化した本発明のポリペプチドに、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーなどを作成させ、結合する分子をスクリーニングすることも考えられる。また、表面プラズモン共鳴現象を利用した結合の検出によるスクリーニングも可能である（例えば ビアコア(BIAcore社製)など）。これらのスクリーニングは、コンビナトリアルケミストリー技術を用いたハイスループットスクリーニングにより行うことも可能である。

本発明のスクリーニングにより得られた本発明のポリペプチドに結合する化合物は、本発明のポリペプチドの活性を調節する化合物の候補となり、アルツハイマー病の予防や治療への応用が考えられる。

## 【0049】

## 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない。本実施例に記載された実験方法を以下に示す。

V642I APP cDNA は以前記載されている (Yamatsujii, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。PS-1 cDNA の M146L変異体および PS-2 cDNA の N141I 変異体は、それぞれ Peter St. George-Hyslop博士 (Sherrington, R. et al. (1985) Nature 315, 754-760)、および Luciano D'Admio博士 (Wolozin, B. et al. (1996) Science 274, 1710-1713) より寄贈された。本実施例で用いた全てのFAD遺伝子は pcDNA ベクター (Funk, C.D. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5638-5642) にコードされている。SOD1 cDNA の ALS関連変異体 (A4T, G85R, G93A) (Takahashi, H. et al. (1994) Acta Neuropathol. 88, 185-8)、および pDN-E/G5H-Q79 は、それぞれ Shoji Tsuji博士 (Niigata University School of Medicine, Niigata, Japan)、および Akira Kakizuka博士

(Osaka Biomedical Research Center, Osaka, Japan) より寄贈された。

【0050】

Humanin をコードするプラスミド pHN は、HN cDNA を pFLAG-CMV-5aベクター (pFLAG) (Eastman Kodak) のポリクローニングサイトに挿入して構築した。すなわち、pFLAG-CMV-5aプラスミドを EcoRI および KpnI で切断し、HNをコードするセンスオリゴヌクレオチド (5'-AATTCAACCATGGCTCCACGAGGGTTCAGCTGTCTCTTAC TTTAACCAAGTGAATTGACCTGCCGTGAAGAGGCGGGCAGGTAC-3' / 配列番号: 1) とアンチオリゴヌクレオチド (5'-CTGCCCCCTCTTCACGGGCAGGTCAATTCACTGGTTAAAAGTAAG AGACAGCTGAACCCCTCGTGGAGCCATGGTG-3' / 配列番号: 2) をライゲーションした。このプラスミドは、FLAGタグ (DYKDDDDK) がC末端に融合したHumaninポリペプチドを発現する。変異HNをコードする pFLAGプラスミド (pHNGおよびpHNA) は、pHNから Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて構築した。配列は、直接塩基配列決定法により確認した。HN-EGFPプラスミドの構築には、まずHNをコードするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドをリン酸化した後、95°C 3分でアニーリングさせ、pEGFP-N3ベクター (Clontech laboratories) のEcoRI-KpnI部位に T4 DNAライゲースによりサブクローニングした。合成 HN ポリペプチド (sHN) および構造改変した合成ポリペプチドは95% 以上に精製したものを用いた。合成HN (sHN) および他の幾つかの合成HN誘導ポリペプチドは2箇所の入手経路から独立して入手したが、どちらも本質的に同じ結果が得られた。抗FLAG抗体は Eastman Kodak (M2モノクローナル抗体, Cat. # IB13010) から購入した。A $\beta$  1-43 は BACHEM (Cat. #H-1586) より購入した。他の試薬は全て商業的に入手可能なものを用いた。

【0051】

pEF-BOSにコードされた発現cDNAライブラリーは、研究所のガイドラインに従って、生検により孤発性ADであることが確認された患者の脳試料（後頭皮質）からポリA<sup>+</sup> RNAを抽出して構築した。ポリA<sup>+</sup> RNAは、NotI部位を含む改変オリゴdTプライマーを用いて逆転写した。二本鎖cDNAにEcoRI-BstXIアダプタープライマー (5'-pGAA TTC ACC ACA-3' および 3'-CTT AAG GTGp-5') をライゲートし、NotIで切断した。低分子DNAを除いた後、cDNAは pEF-BOS の BstXI-NotI 断片にラ

イゲートし、エレクトロポレーションにより XL1 Blue MRF' 株へ形質転換した。初代ライブラリーサイズおよび挿入断片の平均サイズはそれぞれ  $3.2 \times 10^6$  cfu/16ml および 0.9kb であった。

## 【0052】

F11細胞 (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503; Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352) は、18%ウシ胎児血清(FBS)および抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。6ウェルプレート上に  $7 \times 10^4$  /ウェルのF11細胞を播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12 ~16時間培養した後、FAD遺伝子をコードするプラスミドを、HNをコードするプラスミド (pHN等)と共に、リポフェクションにより血清の非存在下 3 時間トランスフェクトし (FAD cDNA 発現プラスミド 1  $\mu$ g、HN cDNA 発現プラスミド 1  $\mu$ g、LipofectAMINE 4  $\mu$ l、Plus試薬 8  $\mu$ l)、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。トランスフェクションから72時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。合成 HN ポリペプチドを用いた実験では、F11細胞 (6 ウェルプレート上で  $7 \times 10^4$  /ウェル) に血清非存在下で上記と同様に FAD遺伝子を 3 時間トランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養した後、様々な濃度の HN ポリペプチドと共に 10% FBSを含む HamF-12 培地で 67 時間培養し、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。SOD1のALS 関連変異体 cDNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

## 【0053】

pHNをトランスフェクトした F11細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) を得るために ~~は、F11細胞に pHN をリポフェクションにて血清非存在下で 3 時間トランスフェクトし (pHN 1  $\mu$ g、LipofectAMINE 2  $\mu$ l、Plus試薬 4  $\mu$ l)、18% FBSを含む Ham F-12 培地で 2 時間培養した。その後培地を 10% FBSを含む HamF-12 培地に交換し、さらに67時間培養した。この培養培地を 1 回凍結融解して CM/F11-pHN とした。CM/F11-vecは、pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞から同様にして調製した。CM/F11-pHN、CM/F11-pHNG、および CM/F11-pHNA のイムノプロット解析では、凍結融解しない培養培地にプロテアーゼインヒビターカクテル (Boehringer M~~

annheim, Cat. #1697498; 2mlの蒸留水に1錠を溶かし、試料の 1/25 容を添加した) を加えた。細胞のライセートを用いたイムノプロット解析では、細胞を PBS で2回洗浄し、30  $\mu$ lのホモジエナイジングバッファー [10mM Tris/HCl (pH7.5), 1mM EDTA, 1% Triton X-100, および 1錠/50mlのプロテアーゼインヒビターカクテル] 中に懸濁した。2回凍結融解した後、細胞のホモジエネートを4°Cで15,000rpmで10分遠心し、上清をTris/Tricineゲル電気泳動してイムノプロット解析に供した。Tris/Tricineゲル電気泳動は、以前記載されたように行った (Schagger, H. and von Jagow, G. (1987) *Analytical Biochemistry* 166, 168-179)。

## 【0054】

F11/EcR/V642I 細胞は、エクダイソン誘導型 V642I APP 発現プラスミドを用いて樹立した。まず、共発現ベクター pVgRXR (Invitrogen) を F11細胞に導入し、それに続くZeocin選択により、エクダイソン受容体 EcR とレチノイドX受容体 RXR の両方を安定に過剰発現する F11細胞 (F11/EcR細胞) を樹立した。多コピーのエクダイソン応答配列を有する pIND ベクター (Invitrogen) に V642I APP cDNA を挿入し、F11/EcR細胞にトランスフェクトした後、G418選択を行った。限界希釈により、F11/EcR/V642I 細胞をクローニングした。F11/EcR/V642I 細胞は、18% FBSと抗生物質を含む HamF-12 培地で培養した。エクダイソン処理の前に、細胞を 10% FBS存在下で 24 時間培養した。その後、10% FBS存在下で細胞培養液にエクダイソン (40  $\mu$ M Ponasterone; Invitrogen Cat. #H101-01) を添加した。エクダイソン処理に応答して、各F11/EcR/V642I 細胞で細胞死が起こり、全細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で 80~90% に達した。F11/EcR/V642I 細胞の更に詳細な解析は、別途記載されている (国際公開番号 WO00/14204参照)。

## 【0055】

エクダイソンを用いた F11/EcR細胞の実験では、F11/EcR細胞を 6 ウエルプレートに  $7 \times 10^4$  /ウェルで播き、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、エクダイソン誘導型プラスミド 1  $\mu$ gを単独で、または HNをコードするプラスミド 1  $\mu$ g と共に、血清非存在下で上記と同様に 3 時間トランスフェクトした。18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養した後、細胞を10% FBSを

含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、エクダイソン (Ponasterone) を培地に添加した (終濃度  $40 \mu M$ )。エクダイソンで処理後 72 時間での細胞死を測定した。合成 sHN ポリペプチドを用いた実験では、細胞に FAD遺伝子を血清非存在下で 3 時間同様にトランスフェクトし、18% FBSを含む HamF-12 培地で 12~16 時間培養し、様々な濃度の sHN ポリペプチドと 10% FBSを含む HamF-12 培地で 2 時間培養し、 $40 \mu M$  の Ponasterone を培地に添加した。エクダイソンで処理後 72 時間での細胞死を、トリパンブルー排除アッセイにより測定した。HD/SCA関連 Q79 c DNA も同様にトランスフェクトし、その神経毒性の試験を行った。

## 【0056】

マウス皮質神経の初代培養は、ポリ-D-リジンコートした 24 ウェルプレート (Sumitomo Bakelite) を用い、血清非存在下および N2 サプリメントの存在下で、以前記載されたように行った (Eksioglu, Y. Z. et al. (1994) Brain Res. 644, 282-90)。この方法により調製した神経の純度は >98% であった。調製した神経 ( $1.25 \times 10^5$  / ウェル,  $250 \mu l$  培地 / ウェル) は、 $10 nM$  または  $10 \mu M$  の sHN ポリペプチド存在下または非存在下で 16 時間プレインキュベートを行い、同じ濃度の sHN ポリペプチドの存在下または非存在下で、 $25 \mu M$  の  $A\beta 1-43$  で 24~72 時間処理を行った。初代培養神経は、培地交換に伴う一過的な乾燥でも傷害を受けるため、 $A\beta 1-43$  による細胞の処理は次のように行った。まず、古い培地の半量 ( $125 \mu l$ ) を捨てた。そして、 $50 \mu M$  の  $A\beta 1-43$  と先に示した濃度の sHN を含む予め温めておいた新鮮な培地  $125 \mu l$  を培養に加えた。

## 【0057】

トリパンブルー排除アッセイは、次のようにして行った。プレウォッシャなしで細胞を血清不~~含~~の培地に穏やかにピペッティングして懸濁した。 $200 \mu l$  の細胞懸濁液に  $50 \mu l$  の 0.4% トリパンブルー溶液 (Sigma, Cat. #T-8154) を加え (終濃度 0.08%)、室温で混合した。トリパンブルー溶液を加えてから 3 分以内に、染色された細胞を計数した。これを基に細胞死の比率を決定した [100-細胞生存率 (%)]。LDHアッセイは、神経を培養した培地  $6 \mu l$  をサンプリングして、キット (LDH-Cytotoxic Test; Wako Pure Chemical Industries, Cat. #299-50601) を用いて行った。カルセイン染色は、以前記載されたようにして行った (Bozy

czko-Coyne, D. et al. (1993) *Journal of Neuroscience Methods* 50, 205-216)。簡単には、 $6\mu\text{M}$ の Calcein-AM {3',6'-Di-(0-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester; Dojindo, Cat. #349-07201} を神経に添加し、Calcein-AM 処理後 30 分以上経過してから蛍光 (ex=490nm, em=515nm) を蛍光顕微鏡により観察し、スペクトロメーターにより測定した。特異的な蛍光は、全蛍光から基底状態の蛍光を差し引いて計算した。基底状態の蛍光は、トリパンブルー陽性度-蛍光強度の直線関係から算出される、100%トリパンブルー陽性に対応する値とした。

アッセイは少なくとも3回、独立してトランスフェクションまたは処理を繰り返して行った。統計解析では Student の t 検定を行った。

#### 【0058】

ノーザンプロット解析のためのオリゴヌクレオチドの放射標識は、Renaissance 3' end labeling system (NEN) を用いてターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) により行った。すなわち、75pmolのプローブオリゴヌクレオチド、100pmolの  $3'-^{32}\text{P}$ -dATP (185TBq/mmol, NEN)、および 36 unit の TdT を  $37^\circ\text{C}$  で 30 分インキュベートした後、標識されたオリゴヌクレオチドをゲル濾過により分離した。この操作により、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{l}$  の標識プローブが得られた。プローブに用いたアンチセンスHNは 5'-CTG CCC GCC TCT TCA CGG GCA GGT CAA TTT CAC TGG TTA AAA GTA AGA GAC AGC TGA ACC CTC GTG GAG CCA TGT GGT G-3' (配列番号: 3) である。cDNA断片は Ready-To-Go random labeling system (Amasham Pharmacia) により放射標識した。すなわち、50~500ng の変性させたDNA断片および  $1.85\text{MBq} [\alpha-^{32}\text{P}] \text{dCTP}$  を  $37^\circ\text{C}$  で 30 分インキュベートした後、標識されたDNA断片をゲル濾過により分離した。この操作により、約  $5 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{g DNA}$  の標識プローブが得られた。ノーザンプロット解析は ExpressHyb (Clontech) を用いて行った。すなわち、プレハイブリダイゼーションの後、組織のポリA<sup>+</sup>-RNAがプロットされた膜 (ヒト組織の膜は Clontech より、マウス組織の膜は Origene より入手) を放射標識されたプローブ ( $2 \sim 5 \times 10^7 \text{ cpm}$ ) に 18 時間浸漬させた。説明書に従って 2 ステップの洗浄を行った後、増感スクリーンを 2 枚使って膜を X 線フィルムに  $-70^\circ\text{C}$  で露光させた。

## 【0059】

## [実施例1] Humaninの同定

F11細胞は、E17.5のラット初代培養神経とマウス神経芽細胞腫 NTG18 を細胞融合させて樹立された、初代培養神経の不死化細胞モデルである (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。分化刺激がなければ、この細胞は活動電位の生成などの初代培養神経に典型的な特徴を保持している (Platika, D. et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3499-3503)。本発明者は、3種の FAD原因遺伝子である V642I/F/G APP をコードする cDNA を F11細胞にトランスフェクトすることにより、APPの V642 変異体の一過的な発現が細胞死を引き起こすことを見出した (Yamatsuji, T. et al. (1996) Science 272, 1349-1352)。そこで本発明者は、最近開発されたエクダイソン誘導系 (No, D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3346-51) を用いて、V642I APPを誘導できるF11クローンの構築を行った。まず、エクダイソン受容体と RXR の両者を過剰発現する F11クローン (F11/EcR) を樹立し、この細胞に、エクダイソン応答配列の制御下に置かれた HSV プロモーターにより発現される V642I APP cDNA をコードする pIND-V642I APP を安定にトランスフェクションすることにより、V642I APPの発現を誘導することができる F11細胞を樹立した。このようにして樹立されたクローン F11/EcR/V642I 細胞は、そのままでは V642I APP をほとんど発現しないが、エクダイソン処理によりコンディショナルに V642I APP を過剰発現することが確かめられた。そしてエクダイソン処理に応答して、各F11/EcR/V642I細胞で細胞死が誘導され、全F11/EcR/V642I細胞中の細胞死の比率は処理後 72 時間で 60~70%、処理後 96 時間で 80~90%に達した。

## 【0060】

これらの細胞を用いて、D' Adamio ら (D' Adamio, L. et al. (1997) Semin. Immunol. 9, 17-23) により開発された方法に基本的に従いながら、それに修正を加えた「デストラップスクリーニング」を行った。最初に記載された「デストラップスクリーニング」においては、Vitoらは正常T細胞 cDNAライブラリーをJurkat細胞にトランスフェクトし、T細胞受容体の刺激により細胞死を誘導し、細胞

死をアンタゴナイズする遺伝子を回収した。本発明者は、デストラップスクリーニングを行い、AD遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズする遺伝子のスクリーニングを試みた。まず、F11/EcR/V642I 細胞に哺乳動物発現 cDNA ライブラリー [cDNAはアルツハイマー病患者の脳試料（後頭の皮質）から調製し、ライブラリーは、エロンゲーションファクタープロモーターを持つ哺乳動物細胞発現ベクター pEF-BOS を用いて構築した] (Mizushima and Nagata, 1990, Nucleic Acids Res. 18: 5322) をトランスフェクトし、この細胞をエクダイソンで 72 時間処理し、生き残った細胞からプラスミドを回収した。この操作を 3 回繰り返し、最終的に約250クローンのプラスミドを得た。各プラスミドを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより、これらのクローンは互いにクロスハイブリダイズする 36 のグループに分類された。最も大きいグループは 28 のクローンからなっていた。

## 【0061】

このグループの cDNA に着目し、各クローンのシークエンスを行った結果、このグループに属するクローンは総合すると、5'配列は Wnt-13 の非コード領域と相同意があり、3'配列は ミトコンドリア 16S リボソーム RNA と相同意があり、C末端にポリA領域を持つ1535bpの融合配列からなるcDNAをコードしていた。この配列全体は新規なものであった（図1）。各クローンの配列を決定したのち、各クローンの一過的なトランスフェクションが、pIND-V642I APP をコトランスフェクトした F11/EcR 細胞のエクダイソンにより誘導される細胞死を有意に抑制するかについてアッセイを行った。細胞死抑制活性を示した各々の配列を比較した結果、V642I APPにより誘導される細胞死をアンタゴナイズする活性は、新規な24アミノ酸のポリペプチド「MAPRGFSCLLLLTSEIDL~~P~~VKRRA」（配列番号：5）をコードする 75bp のオープンリーディングフレーム (ORF) (5' -ATGGCTCCACGA GGGTTCA~~G~~CTGTCTCTTAA~~C~~CCAGTGAAATTGACCTGCCGTGAAGAGGCCGGGATGA-3' / 配列番号：4）によりコードされていることが判明した。本発明者は、この分子を Humanin (HN) と名付けた。

## 【0062】

〔実施例2〕 FAD遺伝子により誘導される細胞死における各クローンの抑制

## 効果

図2～4は、このグループに属する各クローンをコトランスフェクトしたときの効果を示す。F11/EcR細胞 (EcRとRXRとを安定に発現するF11クローンで、エクダイソンによりpINDプラスミドによりコードされる遺伝子の発現が誘導される) にV642I APPをコードするpINDを一過的にトランスフェクトしたところ、エクダイソンの非存在下 (V642I APP非誘導条件) では、72時間後に約20%の細胞が細胞死を起こしたのに対し、エクダイソンの存在下 (V642I APP誘導条件) では、有意に高い割合 (50～60%) の細胞が細胞死を起こした (図2)。F11/EcR細胞に、V642I APPをコードするpINDに加え、DT63をコードするpEF-BOSをトランスフェクトすると、エクダイソン存在下でも、エクダイソンにより誘導される細胞死の有意な増加は観察されなかった。これとは対照的に、pEF-BOS、またはDT171をコードするpEF-BOSを細胞にトランスフェクトした場合には、エクダイソンに応答した細胞死の有意な増加が観察された。図3は、単純な一過的トランスフェクションを用いて4つの各FAD遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、およびN141I PS-2) により誘導される神経細胞死におけるDT63の効果を確認した結果である。各FAD遺伝子 (V642I APP、NL APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNA) をコードするpcDNAのいずれかに加え、空のpEF-BOSをF11細胞にコトランスフェクションした場合、72時間のインキュベーションにより50～70%の細胞が細胞死を起こした。この条件におけるトランスフェクションの効率は約60～70%であるため、各FAD遺伝子を発現する細胞の大部分が、トランスフェクト後72時間で細胞死を起こしたことになる。F11細胞に、各FAD遺伝子に加え、DT63をコードするpEF-BOSをトランスフェクトした場合、細胞死の増加は劇的に抑えられた。このことは、DT63 cDNAが4つのAD遺伝子により誘導される細胞死すべてを、高い効率でアンタゴナイズすることを示している。図4は、HNの全配列を含む他のDTクローンや全配列を含まない他のDTクローン (DT29、DT44、およびDT171 cDNA) の効果を示す。HNの全配列をコードするクローンであるDT29およびDT44では、各FAD遺伝子により誘導される細胞死の顕著な抑制が認められたが、HNの第一ATGコドンを持たないDT171では、細胞死をアンタゴナイズする作用は認められなかった。これらのデータは、HNが

コードする ORF が、4つのすべてのFAD遺伝子による細胞死から神経細胞を保護することを示している。

## 【0063】

そこで本発明者は、HN cDNAを pFLAG ベクターへサブクローニング (pHN) し、V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2の各々のFAD遺伝子による神経細胞死に対する pHN の効果を直接調べた。予想された通り、F11細胞に対する pHN のトランスフェクションは、毒性をほとんど示さないばかりか、各FAD遺伝子による毒性を解消させた（図5）。このアンタゴナיז活性は、pHN により各FAD遺伝子の発現が抑制されたことによるものではない。なぜなら、pHN のコトランスフェクションは、CMVプロモーターにより発現する EGFP の発現を変化させなかったことから（データ省略）、コトランスフェクトされた pHN は、同じ CMV プロモーターから発現される各FAD遺伝子の発現を変化させないことが示されたからである。さらに、V642I APP、NL-APP、および N141I PS-2 のイムノプロッティングによっても、各遺伝子の発現に pHN のコトランスフェクションがほとんど影響を与えないことが確認された（データ省略）。

## 【0064】

## 【実施例3】 HN の細胞外分泌

実験の過程で、pHNをトランスフェクトした F11 細胞の培養上清 (CM/F11-pHN) には、V642I APPを含むFAD遺伝子により誘導される細胞死を有意に抑制する活性があることが判明した。新鮮な培地または空のベクターである pFLAGをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清 (CM/F11-vec) の存在下で V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では高率で細胞死が誘導されたのに対し、CM/F11-pHN存在下で ~~V642I APP cDNAをトランスフェクトした F11細胞では、細胞死が~~ 創的に減少した（図6）。同じことがDTクローンについても観察された。CM/DT29およびCM/DT63は V642I APP により誘導される F11 細胞の細胞死を完全に抑制したが、CM/DT171 は抑制しなかった。これは、HN または HNをコードする cDNA から転写される HNポリペプチドは、培養液中に分泌され、V642I APP による誘導される細胞死を抑制することを示唆している。図7は、CM/F11-pHN中の HN の免疫反応性を抗FLAG抗体で調べた結果を示している。CM/F11-pHN および pHN を

トランスフェクトした細胞のライセートには、HNの免疫反応性を示す 3~4 kDa の単一のバンドを含んでおり、FLAG融合HN の予想される分子量 (3837Da; 図7 左および中央) に一致していた。合成 FLAG融合HNポリペプチド (MAPRGFSCLLLT SEIDLPVKRRAGTDYKDDDDK: 下線は FLAGタグ) (配列番号: 6) を用いて濃度を決定した結果、HNは CM/F11-pHN 中に 8~9  $\mu$ M の濃度で含まれていることがわかった (図7右)。これらの知見は、HN は pHN から転写され培養上清中に分泌されることを示している。

#### 【0065】

【実施例4】 HNはシグナル配列様の活性をコードしている

HN 配列の全24アミノ酸中のN末端の23~24残基は、シグナル配列の必要条件を満たしている (Nielsen, H. et al., 1999, Protein Eng. 12, 3-9; 決定のためのプログラムは<<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>>から提供されている)。細胞内で発現したHNが  $\mu$ Mの濃度で培養液中に分泌される事実から、シグナル配列活性そのものではないが、シグナル配列に似た活性がHNに含まれていることが示唆される。FLAGタグはC末端に位置しており、分泌されたHNポリペプチドは FLAG融合HNに予想されるサイズと一致する分子量を保持していることから、HNの配列全体がシグナル配列様の分泌活性をコードしていることが示唆される

これを確認するため、HN配列のシグナル配列としての性質を計算上失わせる L9R 変異が、HNの分泌に影響するかを調べた。予想通り、L9R HN変異体 (HNR) (配列番号: 7) はこれをコードするcDNAのトランスフェクションにより細胞の内側で発現したが、培養上清中には分泌されなかった (図8上)。この結果は、HN配列のシグナル配列様の分泌活性は、HNの一次構造に書き込まれていることを証明する。これとは別に、HN配列をEGFPのN末端に融合 (HN-EGFP) させ、HNのシグナル配列活性を直接的に調べた。N末端にHNを融合させたEGFPはトランスフェクトされた細胞の培養上清に分泌されたが、もともとのEGFPは細胞外に全く分泌されなかった (図8下)。N末端にHNRを融合させたEGFPは、EGFP同様、全く分泌されなかった。これらのデータから、HNそのものがシグナル配列様活性をコードしていることが実証された。このように、HNはシグナル配列様分泌活性と生物学的

活性とを同時にコードしているユニークな分泌蛋白質である。

【0066】

〔実施例5〕 V642I APPにより誘導される細胞死における合成 HN ポリペプチドの抑制効果

本発明者は次に、合成 HN ポリペプチド MAPRGFSCLLLTSEIDL~~P~~VKRRA (配列番号：5) を合成し、V642I APP により誘導される神経細胞死において、このポリペプチドを細胞外から加えた場合の作用を調べた。F11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、10  $\mu$ M の合成 HN ポリペプチド (sHN) 存在下で培養したところ、V642I APP により誘導される細胞死は劇的に抑制された (図9)。10 nM sHN では極弱い抑制を示すのみであったが、抑制作用は添加する sHN の濃度に依存しており、1~10  $\mu$ M のポリペプチドのレベルで完全な抑制に達した。IC<sub>50</sub> 値は約100nMであった。この用量依存曲線は、CM/F11-pHN中に分泌された HN が 約10  $\mu$ Mのレベルで V642I APP により誘導される細胞死を効果的に抑制した事実と一致している。

【0067】

〔実施例6〕 V642I APPにより誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

本発明者はさらに、sHN の細胞死抑制作用が特異的な一次構造によるものであるのかを検討した (図9)。ポリペプチドとして S14G (MAPRGFSCLLLTGEIDL~~P~~VKRRA : 下線のGはSから置換されている ; HNGと称す) (配列番号：8) を用いると、V642I APP により誘導される細胞死に対し、10nM以下の濃度において完全なアンタゴナיז効果が認められ、IC<sub>50</sub> は約100pMであった。これに対して、C8A HN ポリペプチド (MAPRGFSALLLTSEIDL~~P~~VKRRA : 下線のAはCから置換された ; HNAと称す) (配列番号：9) は 100  $\mu$ M までの濃度において、V642I APP により誘導される細胞死を有意に抑制することはできなかった。8位の Cys が重要であることは、8位の Cys を介した HN のダイマー (C8-C8 HN) により得られた結果からも示唆された。C8-C8 HN のアンタゴナיז作用のレベルは、元々の HN と HNA の中間であった。また、対照的に、HN のC末端の KRRA を AAAA に置換した誘導体 (配列番号：10) は、元々の HNポリペプチドと同様の作用能を示した。

これらの結果は、HN の抑制活性に一次構造が本質的な役割をもつと共に、特定のアミノ酸残基が決まった役割を有していることを示している。

## 【0068】

【実施例7】 FAD遺伝子により誘導される細胞死における HN ポリペプチドおよびその構造的誘導体の抑制効果

次に、他のFAD遺伝子、すなわち NL-APP、M146L PS-1、および N141I PS-2 により誘導される細胞死に対する sHN、合成 HNG (sHNG) 、および合成 HNA (sHNA) の効果を調べた。図10に示したように、元々の sHN は 3 つのFAD遺伝子のいずれにおいても同様の用量一応答特性を示し、 $1 \mu M$  の濃度で各FAD遺伝子により誘導される神経細胞死を妨げた。sHNA は  $100 \mu M$  までの濃度において、いずれのFAD遺伝子による細胞死もアンタゴナイズしなかった。これに対し、sHNG は  $10 nM$  以下の濃度で、各FAD遺伝子による細胞死を抑制する完全な活性を有していた。これは、HN の作用は S14G の置換により 100から1000倍に高められることを示している。V642I APP により誘導される細胞死に対する sHNG の作用 (図9) を合わせて考えると、sHNG は  $10 nM$  以下の濃度で、4 種の異なるタイプの FAD遺伝子により誘導される神経細胞死を、完全にアンタゴナイズすることができると結論される。

## 【0069】

【実施例8】 HN およびその構造的誘導体を発現するベクターの導入による細胞死抑制効果

合成ポリペプチドで得られたデータを確認するため、次に HNG または HNA をコードするプラスミド (それぞれ pHNG または pHNA) の細胞死抑制効果を、pHN と比較して調べた。図11に示したように、pHNGのコトランスフェクションは、pHNの場合と同様に、4種すべての FAD 遺伝子により誘導される細胞死を完全に抑制した。これとは対照的に、pHNAのコトランスフェクションでは、HNAポリペプチドは、pHNおよびpHNGの場合と同様に産生され、培地中に分泌されている (図7) にも関わらず、いずれの FAD 遺伝子により誘導される細胞死も抑制しなかった。各プラスミドから得られたこれらのデータは、先に述べたポリペプチドの解析結果を支持しているのみならず、CM/F11-pHNG (pHNGをトランスフェク

トしたF11細胞の培養上清) 中の HNG 濃度は 10nM を超えていることを示唆している。これに一致して、イムノプロット解析では、pHNG をトランスフェクトした F11 細胞 からの培養上清 (CM/F11-pHNG) には HNGポリペプチドが約 10  $\mu$ M 含まれていた (図 7 右)。これらのデータは、HNの細胞死抑制活性はその特異的なアミノ酸構造により決定されており、細胞外から添加された HN ポリペプチドによる細胞死抑制作用は、細胞内で発現された HN cDNA によっても再現され得ることを示している。

### 【0070】

#### 〔実施例 9〕 HN の細胞死抑制効果の特異性

HNの作用の特異性を明らかにするため、次に HN cDNA または HN ポリペプチドが、他の神経変性疾患の原因遺伝子により誘導される細胞死をアンタゴナイズすることができるかを調べた。72回の繰り返しを持つポリグルタミン Q79 は、ハンチントン病 (HD) や、ある種の脊髄小脳性運動失調症 (spinocerebellar atrophy; SCA) の原因になっていると考えられている (Ikeda, H. et al. (1996) *Nat. Genet.* 13, 196-202; Kakizuka, A. (1997) *Curr. Opin. Neurol.* 10, 285-90)。Q79の発現が神経細胞の細胞死を引き起こすことが報告されているよう に、Q79 の発現により F11 細胞は細胞死を起こした (図 1 2)。エクダイソンに より発現が誘導される Q79 プラスミド (pDN-E/G5H-Q79) を F11/EcR 細胞にト ランスフェクトし、エクダイソンの存在下または非存在下で神経毒性の試験を行 った。この系において、pDN-E/G5H-Q79 を空ベクター (pFLAG) と共に F11/EcR 細胞にトランスフェクションした場合は、エクダイソン処理に応答して細胞死の 比率は顕著に増加した (図 1 2A)。F11/EcR 細胞に、pDN-E/G5H-Q79 を pHN、p HNG、または pHNA と共にトランスフェクトした場合でも、エクダイソン処理に より、同じように高い比率の細胞死が誘導された。これに対し、エクダイソンに より誘導されるいづれのFAD遺伝子の発現により引き起こされる F11/EcR 細胞の 細胞死も、pHNのコトランスフェクションにより効果的に抑制された (図 1 2B)。 sHN を用いた実験においても、Q79により誘導される細胞死は抑制されなかっ た (図 1 2C)。F11/EcR 細胞に pDN-E/G5H-Q79 をトランスフェクトした場合、 4 種のFAD遺伝子による F11/EcR 細胞の細胞死を sHN や sHNG が完全に抑制で

きる濃度の sHN、sHNG、または sHNA の存在下においても、非存在下における場合と同様、エクダイソンによって大幅な細胞死が引き起こされた（図12D）。

## 【0071】

本発明者はまた、家族性筋萎縮性側索硬化症（familial amyotrophic lateral sclerosis；家族性ALS）に関連した Cu/Zn依存性スーパーオキサイドディスクターゼ（SOD1）の A4T、G85R、または G93A 変異体により誘導される神経細胞死に対する HN の効果を調べた。家族性ALS関連 SOD1 変異体 の発現が哺乳動物神経細胞の細胞死を引き起こすという以前の報告（Rabizadeh, S. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 3024-8; Ghadge, G. D. et al. (1997) J. Neurosci. 17, 8756-66）と一致して、これらすべての変異体において、それぞれの変異体を発現する cDNA を F11 細胞にトランスフェクトすることにより、有意に細胞死が引き起こされた。そして、各SOD1変異遺伝子に加え、pHNを F11 細胞にコトランスフェクトした場合でも、同様の高い細胞死が誘導された（図13A）。図13Bに示したように、100 $\mu$ M のsHN、sHNG、または sHNA のいずれによっても、各家族性ALS関連 SOD1 変異体による細胞死の抑制は認められなかつた。これらのデータは、HN は FAD 遺伝子により触発される細胞死実行機構を抑制する細胞内機構を活性化するが、他の神経変性疾患遺伝子による細胞死には機能しないことを示唆しており、HN cDNA および HN ポリペプチドのアンタゴナイズ効果は、ADに関連する神経細胞死に共通かつ特異的であることを証拠付ける。

## 【0072】

## 〔実施例10〕 初代神経培養の細胞死における HN の抑制効果

本発明者は、HN による、初代培養神経のADに関連する傷害からの保護について調べた。~~AB~~ は老人斑の主要なペプチド成分で、AD脳を病理学的に特徴付ける細胞外沈着物であり、ADの病理機構に関与していると言われている（Selkoe, D. J. (1994) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-47; Cummings, J. L. et al. (1998) Neurology 51, S2-17; discussion S65-67）。AB 処理は初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている（Loo, D. T. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7951-7955; Gschwind, M. and Huber, G. (1995) J. Neurochem. 65, 292-300）。図14に示すように、初代培養皮質神経を

25  $\mu$ M の  $\text{A}\beta$  1-43 で 48~72時間処理すると、N2サプリメントの存在下または非存在下にて、軸索の異栄養変化 (dystrophic neuritic changes) を伴う広範な細胞死が引き起こされた。初代培養神経を 10  $\mu$ M の sHN で前処理すると、 $\text{A}\beta$  で誘導される細胞死と共に軸索の異栄養変化が劇的に抑制された。 $\text{A}\beta$  1-43処理により、トリパンブルー排除で測定した細胞死 (図15左パネル) と、細胞から放出された LDH により測定した細胞傷害 (図16) が観察されたが、10  $\mu$ M の sHN 処理により、細胞の生存を示すこれらの指標はベーサルな状態で観察されたレベルに完全に回復した。同じ条件で、100ng/ml の NGF は、 $\text{A}\beta$  により誘導される神経細胞の生存およびLDH放出の増加をアンタゴナイズする効果はなかった (データ省略)。 $\text{A}\beta$  により誘導される神経細胞死のアンタゴナイズに sHN が劇的な効果をあげたのに対して、10  $\mu$ M sHN で神経を同様に処理しても、初代培養神経に対する 20  $\mu$ M のエトポサイド (etoposide) の毒性を防ぐことはできなかった (図15右パネルおよび図16)。エトポサイドは抗癌剤であり、初代培養神経の細胞死を引き起こすことが報告されている (Nakajima, M. et al. (1994) *Brain Res.* 641, 350-2)。これらの知見は、HN は  $\text{A}\beta$  1-43 により誘導される神経細胞死を、選択的な機構でアンタゴナイズするという考えを支持する。

F11 細胞を用いた FAD 遺伝子の実験で指摘したのと同様に、10nM sHN は、 $\text{A}\beta$  1-43 による細胞死および軸索の異栄養変化から神経を完全に保護したが、10nM sHN または 10  $\mu$ M sHN は、いずれも  $\text{A}\beta$  の神経毒性に対し効果を示さなかった (図14)。これらのデータは、細胞傷害のアッセイである LDH 放出アッセイ (図16) およびトリパンブルー排除アッセイ (図15) により確かめられたのみならず、生細胞のアッセイであるカルセイン (Calcein) 染色アッセイ (図17および18) によっても確かめられた。このように、HN は初代培養神経においても、クローニングされた神経細胞における場合と同様に効果を有していることが示された。さらに、これらのデータから、HN の構造を特異的に認識する受容体 (群) が、F11細胞と初代培養神経に共通して存在していると考えることができる。

## 【0073】

〔実施例11〕 HN mRNA の発現

$\beta$ -actin mRNAをポジティブコントロールとして、様々な組織における HN mRNA

の発現を調べた。ヒト組織のノーザンプロット解析により、HN mRNAは心臓、骨格筋、腎臓、および肝臓において顕著に発現していることが判明した（図19a）。それより少ないが、依然として有意な発現が脳および消化管（gastrointestinal tract）に認められた。胸腺、脾臓、および末梢血白血球を含む免疫系にはほとんどmRNAは検出されなかった。発現している主要なmRNAのサイズは約1.6kbであり、これは、HNを含む最も長いDT cDNAの予想されるサイズに相当する。約3kbおよび約1kbのサイズの異なるmRNAも存在した。HNの3'領域をコードし、HNをコードしていないDT77（図1参照）をプローブにした場合も、またHNの-440から-422の5'領域に対するアンチセンスプライマー（GGGTGTTGAGCTTGAACGC／配列番号：11）をプローブとした場合も、上記と同様の結果が得られ、これら全てのバンドが検出されたことから、これらのmRNAは全長HN mRNAとそのスプライシングバリエントであると予想される。ヒト心臓cDNAライブラリーから、本発明者はDT44の位置と事実上同一であり、1kbを超えるcDNAを幾つか単離した。マウス組織においても、以下の点を除き類似した結果を得た（図20）。第一点はマウスの骨格筋および肝臓はヒト組織に比べHN mRNA量が少なかったことである。しかししながら、他のマウスの骨格筋および肝臓のHN mRNAは多かった（データ省略）ことから、量的な差異は個体の条件が影響することが考えられる。第二点は、マウス心臓および腎臓において、1kbの小さなmRNAが、1.6kbのものと同等かそれ以上発現していることである。マウス脳、心臓、および骨格筋では特異的に、約0.4kbのmRNAがさらに発現していた。脳の発現領域を詳しく解析した結果、脳の各領域の中では、小脳および後頭葉で比較的多量のmRNAが発現していた。これらの結果は、HN mRNAは主に中枢神経系以外の器官で産生されていることを示している。このことからして、HNは血流に分泌され脳神経に運ばれている可能性が考えられる。または、脳内で局所的に合成されるHNが保護作用を発揮する可能性も想定される。これに関しては、AD脳で神経細胞死に対し最も抵抗力を示す領域である小脳および後頭葉で HN mRNA が最も合成されていることは興味深い。

## 【0074】

## [実施例12] HNの分泌欠損変異体の効果

これまでのデータから、細胞外から加えたHNポリペプチドが細胞の外側から作

用することは明白であるが、細胞表面から取りこまれたHNポリペプチドが細胞内部で効果を発揮している可能性は否定できない。初代培養神経の $\text{A}\beta$  1-40による細胞死が、小胞体 (ER) に存在する主要なカスパーゼである caspase-12 により媒介されるという報告 (Nakagawa, T. et al. (2000) *Nature* 403, 98-103) があるように、HNがER内で作用している可能性も考えられる。もしそうであるなら、ERで合成されたHNは *in situ* で防御シグナルを生成できることになる。そこで、分泌欠損型変異 L9R HN を用いてこれを検証した。

F11細胞に V621I APP cDNA と L9R HN (HNR) cDNA をトランスフェクトした細胞は、V621I APP cDNA を単独でトランスフェクトした細胞と同様の強い細胞死が観察された (表1右レーン)。V621I APP cDNA と HNR cDNA をトランスフェクトした細胞の細胞死は、培養液にsHNが存在すると完全に抑制されることから、細胞内で発現されたHNRに防御活性がないことがさらに確認された。これとは対照的に、細胞外からsHNRを添加すると、V642I APP cDNAを同じ条件でトランスフェクトしても細胞死が誘導されないことが判明した (表1左レーン)。HNR cDNAからERで翻訳されたHNRは培養液中には分泌されない (図8上パネル) ので、HNが持つ細胞をレスキューする機能には、HNポリペプチドが細胞内ではなく細胞外に存在する必要があることになる。これらのデータは、HNは細胞の外側から作用することによってのみその効果を発揮できることを示している。

## 【0075】

【表1】

transfectionなし	13.2±0.7	pcDNA + pFLAG	10.3±2.0
pcDNA	11.5±0.6	V642I APP + pFLAG	52.2±1.5*
V642I APP	53.7±2.3	V642I APP + pHN	17.6±2.2
V642I APP + sHN	14.4±1.2*	V642I APP + pHNA	53.2±0.6
V642I APP + sHNA	52.5±3.0	V642I APP + pHNR	52.0±2.1**
V642I APP + sHNR	17.7±2.2*	V642I APP + pHNR + sHN	15.3±2.0*

(F11細胞にpcDNAまたはV642I APP cDNAをトランスフェクトする時に、pFLAGま

たはpHNプラスミド（右）を同時にコトランスフェクトするか、または $10\mu\text{M}$  sHNポリペプチド（左）で処理した。72時間培養後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死（%）を測定した。値は3回の独立したトランスフェクションおよび処理の平均±S.D.を示す。<sup>\*</sup> : V642I APPによる細胞死に対して有意な抑制（ $p<0.01$ ）、<sup>\*\*</sup> : V642I APPによる細胞死に対して有意な抑制なし）

## 【0076】

## 〔実施例13〕 HNの防御活性における詳細な構造／機能関係

HNの一次構造と防御活性との詳細な関係性を調べた。図21は欠失したHNポリペプチドがV642I APPをアンタゴナイズするかを解析した結果を示している。F11細胞に V642I APP cDNAをトランスフェクトし、 $10\mu\text{M}$ のHN誘導体の存在下で培養した。この系において、HNポリペプチドのN末端から2残基を欠失させても、細胞保護活性にはほとんど影響がなかった。これに対し、N末端から3残基を欠失させるとHNの活性は消失した。このことは、N末側の最末端の Met-Ala はなくてもよいが、3番目の Pro は活性に本質的であることを示唆する。同様のC末端側の欠失実験により、図21に示すように、HNの完全な保護活性を維持するためには、C末側最末端の Val-Lys-Arg-Arg-Ala はなくてもよいが、19番目の Pro は活性に本質的であることが判明した。従って、最大の活性のために必要な最少の領域は Pro3-Pro19 であり、これを HN-17（配列番号：21）と名付けた。

## 【0077】

図22の左上パネルは、4つのFAD遺伝子による神経細胞死に対する、N末端の3残基を欠失したHN（△N3）およびHN-17の効果を示している。HN-17は、上記の V642I APP 以外の3つのFAD遺伝子による細胞死に対しても、十分にアンタゴナイズする活性を示すのに対し、△N3ペプチドはいずれの遺伝子に対しても活性を示さなかった。図22の他のパネルは、4つのFAD遺伝子の各々による神経細胞死における合成HN-17の効果の用量応答関係を示す。M146L PS-1 による細胞死の抑制に対しては、もともとのHNに比べHN-17は僅かに活性が低下しより高い濃度を必要としたものの、低 $\mu\text{M}$ のHN-17は4つのFAD遺伝子による細胞死全てに対し共通して、十分な保護作用を発揮した。この結果は、N末端の2残基およびC末端の5残基は、この共通した保護作用には必要ではないことを示唆している。

## 【0078】

HN-17の保護作用にその残基が本質的であるのかをさらに検証した。まず、S14 GのHN-17 (HNG-17) (配列番号：24) 10nM が、10nMのHNGを用いた場合と同様、4つのFAD遺伝子によるF11細胞の細胞死、および $\text{A}\beta$  1-43による初代培養神経の細胞死を完全にアンタゴナイスできることが確認された。次に、HNG-17の Pro3 から Pro19 までの各残基を1つずつAlaに置換したHNG-17誘導体（配列番号：25～41）を合成し、25 $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta$  1-43による初代培養神経の細胞死における効果を調べた。図23は、Alaに置換した各HNG-17誘導体の細胞死抑制効果の試験結果である。細胞死の値を示すグラフの下に置換残基を示した。この試験の結果、 $\text{A}\beta$  により誘導される細胞死からの神経保護に本質的な以下の7残基が明確に同定された：3番目のPro、8番目のCys、9番目のLeu、12番目のLeu、13番目のThr、14番目のGly（もともとはSer）、および19番目のPro。この試験は、他の残基の役割を否定するものではないが、それらの残基は防御活性に影響を与えることなくAlaに置換することが可能であった。3番目のPro、8番目のCys、14番目のGly、および19番目のProが不可欠であることは、HN欠失実験（図21）および前述のHNのアミノ酸残基置換実験（図9および10）で得られたデータとも一致している。14番目のSerをAlaに置換すると防御活性が失われるにも関わらず、Glyに置換すると防御活性が高まることは注目に値する。このことから、特定の残基および側鎖の軽度の変化が、 $\text{A}\beta$  1-43に対するHNの防御活性を上昇させたり下降させたりすることが示された。

## 【0079】

図23の他のパネルは4つのFAD遺伝子の各々によるF11神経細胞の細胞死に対するHNG-17のAla置換体（Ala-scanned HNG-17）の効果を調べた結果を示している。このデータから、アンタゴニズムに本質的役割を果たす残基は、 $\text{A}\beta$  により誘導される初代培養神経に対するアンタゴニズムにおいて得られた結果と全く同一であることが明らかとなった。これは、HNが、ADの傷害の幅広いスペクトラムにおいて、共通の機構を介して神経細胞を保護することを示唆している。これら7つの本質的な残基は、細胞表面の特定の機構（受容体等）に認識されるのに必要なある種の2次構造を維持している可能性がある。

## 【0080】

HNおよびHNGの活性の高い能力と共に、その活性が一次構造に厳格に依存している事実は、特異的受容体の存在を示唆している。これを支持するように、4つのFAD遺伝子および $\text{A}\beta$ 1-43により引き起こされる神経細胞死に対するHNのアンタゴニズムは、上記のように互いに非常に類似した用量応答特性を示した。このことは、ポジティブ (S14G) およびネガティブ (C8A) な機能を持つHN誘導体のいずれにも当てはまる。詳細な構造／機能関係の解析により、これら様々なAD傷害に対するアンタゴニズムに必須なHNの領域および残基は正確に一致することが実証された。さらに、分泌能欠損型の変異体の実験により、HNが細胞外に分泌されることが、防御活性の発揮に必須であることが明らかとなった。これらのデータは、HNの作用が細胞の外側から特異的な細胞表面受容体介していることを示している。

## 【0081】

## 【実施例14】 HNG誘導体の作製

HNG (S14G HN) の変異により、その作用をさらに高めることができるかを検証した。HNGの複数のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換して、その神経防御作用を調べた結果、HNGに対して2箇所を変異 R4A/F6A (配列番号: 4 2) させると、HNGよりもさらに高いレスキュー活性を示すことを見出した。AGA-HNGと名付けられたこのポリペプチドは、FAD遺伝子による株化神経細胞の細胞死を僅か 0.1nM の濃度で完全にレスキューするのみならず、初代培養神経の  $\text{A}\beta$  による細胞死を 0.3nM の濃度で完全にレスキューした (図24)。HNGの4番目のArgおよび6番目のPheは、それぞれトリプシン様プロテアーゼおよびキモトリプシン用プロテアーゼにより切断され得る部位 (図24A参照) であるため、R4A/F6A の置換により HNG は分解に対してより抵抗性となる可能性が高い。AGA-HNGは、その濃度よりも約100000倍もの高濃度の $\text{A}\beta$  の神経毒性を解消させるという事実は、AGA-HNGがこれまでにない高い作用を持つことを意味している。このように広いスペクトラムを持ち、高い神経保護作用を示す抗AD剤はこれまで全く報告されていない。AGA-HNGまたはその誘導体は、ADの化学療法への応用が期待される。

## 【0082】

## 【発明の効果】

本発明によって、アルツハイマーに関連する神経変性をアンタゴナイズする能力を有するポリペプチド Humanin が提供された。該ポリペプチドは、4種のFAD遺伝子および $\text{A}\beta$ により誘導される神経細胞の細胞死をアンタゴナイズする能力を有する初めての分子であり、クローン化された神経細胞において、V642I APP、NL-APP、PS-1変異体、およびPS-2変異体による細胞死を、そして初代培養神経において  $\text{A}\beta$  1-43 による細胞死をアンタゴナイズできる。細胞外に作用し、既知のすべてのタイプの早発型FAD遺伝子および $\text{A}\beta$ をアンタゴナイズするという広いスペクトラムを持つ防御因子はこれまで全く同定されていない。特に、HNG が 10nM 足らずでADに関連する神経毒性を完全にアンタゴナイズするということは、アルツハイマーに関連する神経細胞死の機構解明に有用であると同時に、臨床応用の観点からも極めて有用である。HNGは防御作用の極めて高い作用能、汎用性、および厳格な特異性を有しており、HNG、AGA-HNG、およびそれらから生み出される誘導体は、アルツハイマー病に関連する神経細胞死を予防する医薬として、また新たなアルツハイマー病治療薬開発のためのシード化合物として極めて有用である。

【0083】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Keio University

<120> Humanin, a novel polypeptide that protects neuronal  
death

&lt;130&gt; KUV-102DP1

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

<150> JP 1999-264679

<151> 1999-09-17

<160> 42

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 1

aattcaccat ggctccacga gggttcagct gtctcttact tttaaccagt gaaattgacc 60

tgcggcgtaa gaggcgggca ggtac 85

<210> 2

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 2

ctgccccct cttcacgggc aggtcaattt cactggtaa aagtaagaga cagctgaacc 60

ctcgtggagc catggtg

77

<210> 3

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 3

ctgccccct cttcacgggc aggtcaattt cactggtaa aagtaagaga cagctgaacc 60

ctcgtggagc catgtggtg

79

<210> 4

<211> 75

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(72)

<400> 4

atg gct cca cga ggg ttc agc tgt ctc tta ctt tta acc agt gaa att 48

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

gac ctg ccc gtg aag agg cgg gca tga

75

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (sHN-FLAG)

<400> 6

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala Gly Thr Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

20

25

30

Asp Lys

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (HNR)

<400> 7

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Arg Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (HNG)

<400> 8

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile  
1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (HNA)

<400> 9

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1 5 10 15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 10

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Ala Ala Ala

20

---

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

---

<400> 11

gggtgttgag cttgaacgc

19

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (deltaN1-Humanin)

<400> 12

Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp

1

5

10

15

Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (deltaN2-Humanin)

<400> 13

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (deltaN3-Humanin)

<400> 14

Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro

1

5

10

15

Val Lys Arg Arg Ala

20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (deltaN4-Humanin)

<400> 15

Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val

1

5

10

15

Lys Arg Arg Ala

20

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (deltaN5-Humanin)

<400> 16

Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys

1

5

10

15

Arg Arg Ala

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (deltaN6-Humanin)

<400> 17

Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys Arg

1

5

10

15

Arg Ala

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (deltaN7-Humanin)

---

<400> 18

Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg

1

5

10

15

Ala

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (deltaN8-Humanin)

<400> 19

Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala  
1 5 10 15

<210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (deltaN2 deltaC6-Humanin)

---

<400> 20

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu  
1 5 10 15

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

---

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (deltaN2 deltaC5-Humanin; HN-17)

<400> 21

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence (deltaN2 deltaC4-Humanin)

---

<400> 22

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro Val

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence (deltaC4-Humanin)

<400> 23

Met Ala Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ser Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val

20

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence (HNG-17)

<400> 24

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 25

Ala Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 26

Pro Ala Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 27

Pro Arg Ala Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

---

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

---

<400> 28

Pro Arg Gly Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 29

Pro Arg Gly Phe Ala Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 30

Pro Arg Gly Phe Ser Ala Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 31

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

---

<400> 31

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Ala Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

---

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

**synthesized sequence**

<400> 32

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Ala Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu  
1 5 10 15

Pro

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

---

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

---

<400> 33

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Ala Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu  
1 5 10 15

Pro

---

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 34

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Ala Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 35

~~Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Ala Gly Glu Ile Asp Leu~~

---

1

5

10

15

Pro

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 36

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Ala Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

---

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

---

<400> 37

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Ala Ile Asp Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 38

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ala Asp Leu

1

5

10

15

---

Pro

---

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 39

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Ala Leu

1

5

10

15

Pro

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 40

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Ala

1

5

10

15

Pro

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 41

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 42

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 42

Met Ala Pro Ala Gly Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

Humanin cDNA クローンにおける、V642I APPによる細胞死をアンタゴナイズする活性をコードする領域を示す図である。

DNA断片を、最も長い配列（-934から600；1番目の塩基は Humanin ORF の最初の塩基に対応し、その1塩基前は -1 である）に対して整列させた。V642I APP により誘導される F11/EcR 細胞の細胞死に対するそれらの活性を横に示す。F11/EcR 細胞に V642I APP をコードする pIND (1 μg) と共に、1 μgの pEF-BOS またはそれぞれのDNA断片をコードする pEF-BOS を3時間トランスフェクトし、続いてエクダイソンで72時間処理した。トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。pEF-BOS をトランスフェクトした細胞とそれぞれのDNA断片をトランスフェクトした細胞との間で、細胞死に統計的に有意な差があった場合、このDNA断片にはアンタゴナイス活性があると判定し、"Y"で示した。"N"は有意なアンタゴナイス活性がなかったことを示す。

## 【図2】

エクダイソンにより誘導される V642I APP の発現による神経細胞死における DT63 と DT171 クローンの効果を示す図である。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 V642I APP プラスミドと共に、pEF-BOS、DT63、またはDT171 (DT63とD171は pEF-BOS にクローン化されている) をトランスフェクトし、Ponasterone (エクダイソン) 処理を行った。エクダイソン処理を行わない群も設定した。エクダイソン処理の 72 時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。また、エクダイソン処理を行わない群も同様に測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。DT63とDT171は図1に示されている。

## 【図3】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における DT63 クローンの効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (vec) または DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。

## 【図4】

FAD遺伝子のトランスフェクションによる F11 細胞の細胞死における DT29、D

T44、および DT171 クローンの効果を示す図である。図3と同様に、F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (pBOS) または DT クローンをコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。DT29とDT44は図1に示されている。3つの実験を同時に行つたところ、ベーサルな細胞死の比率（トランスフェクションなし、pcDNA+pBOS）は共通していた。同様の実験は少なくとも3回行つた。図中のエラーバーのある数値は平均±S.D.を表す。

## 【図5】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における、Humaninをコードするプラスミド pHN の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN) をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。

## 【図6】

V642I APPにより誘導される神経細胞死における、pHN をトランスフェクトしたF11細胞からの培養上清の抑制効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APPをコードする pcDNA を血清非存在下で3時間トランスフェクトし、18%FBSを含む HamF-12 で2時間培養した後、CM/F11-pHN (CM/pHN) 、CN/F11-vec (CM/vec) 、または新鮮な培地 (18%FBSを含む新しい HamF-12) で67時間培養した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。p<0.01 は Student の t 検定による。

## 【図7】

pHNをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清に含まれる HN ポリペプチドの免疫反応性を示す図である。左と中央のパネルは、細胞抽出液 (30 μg protein) および培養上清 (20 μl) をTris/Tricineゲル電気泳動後、抗FLAG抗体を用いたイムノブロットを行つた結果を示す (1: トランスフェクションなしの細胞；

2: pFLAGをトランスフェクトした細胞； 3: pHNをトランスフェクトした細胞)。右のパネルは、pHN、pHNG、またはpHNAをトランスフェクトした細胞の培養上清を同様に解析した結果である。右の3レーンは、培養上清中に含まれるHNポリペプチドのタイマーを決定するために、図示した濃度のsHN-FLAG (MAPRGFSCL LLLTSEIDLPVKRRAGTDYKDDDDK: 下線はFLAGタグ) (配列番号: 6) のイムノプロットを行った結果を示す。同様の実験は4回以上繰り返した。

## 【図8】

上パネル: L9R変異によりHNが細胞外に分泌されなくなることを示す図である。F11細胞にpHN、pHNA、またはpHNR (L9R HNをコードするpFLAG)をトランスフェクトし、72時間後に細胞抽出液および培養上清を回収し、図7と同様に抗FLAG抗体を用いて解析した。

下パネル: HNのシグナル配列様分泌活性を示す図である。EGFP cDNA (レーン2)、HN-EGFP融合cDNA (レーン3)、またはHNR-EGFP cDNA (レーン4)をF11細胞にトランスフェクトし、72時間後に細胞抽出液 (左下パネル, 10 μg/レーン) または培養上清 (右下パネル, 20 μg/レーン)を抗EGFPポリクローナル抗体 (1/200) およびHRP結合抗ウサギIgG抗体 (1/5000)を用いたイムノプロットにより解析した。両パネルのレーン1はトランスフェクションを行わなかったF11細胞由來の資料をプロットした結果を示す。左のバーに分子量をダルトンで示した。

## 【図9】

V642I APPにより誘導される神経細胞死における、合成HN (sHN) およびその構造的誘導体の効果を示す図である。F11細胞にV642I APPをコードするpcDNAをトランスフェクトし、様々な濃度のsHN (元々のHN) (配列番号: 5)、sHNG (S14G) (配列番号: 8)、sHNA (C8A) (配列番号: 9)、C8を介したsHNのダイマー型 (C8-C8)、およびC末のKRRAをAAAAに置換したsHN (KRRA21/22/23/24AAAA) (配列番号: 10)で処理した。トランスフェクション72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

## 【図10】

M146L PS-1、N141I PS-2、またはNL-APPにより誘導される神経細胞死における

る sHN、sHNG、または sHNA の効果を示す図である。図 9 と同様に、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP cDNA をトランスフェクトした F11 細胞を、様々な濃度の sHN (元々の HN)、sHNG (S14G)、または sHNA (C8A) で処理した。トランスフェクション 72 時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3 回の独立した実験の平均士 S.D. を示す。

## 【図 1 1】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞における pHN、pHNG、または pHNA の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN、pHNG、または pHNA) をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。3 回の独立した実験の平均士 S.D. を示す。

## 【図 1 2】

ポリグルタミンリピート Q79 により誘導される神経細胞死における HN およびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て 3 回の独立した実験の平均士 S.D. を示す。

A: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHN、pHNG、または pHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 発現プラスミドと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN、pHNG、もしくは pHNA をトランスフェクトし、エクダイソン存在下 (+) または非存在下 (-) で 72 時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHN のコトランスフェクションによる有意な抑制効果。A と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 FAD遺伝子プラスミドと共に、pFLAG または pHN をトランスフェクトし、エクダイソン存在下 (+) または非存在下 (-) で 72 時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

C: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソ

ン誘導型 Q79 プラスミドをトランスフェクトし、 $1\mu\text{M}$  の sHN、sHNG、または sHNA で処理し、その後エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

D: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141 I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHNの有意な抑制効果。C と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドをトランスフェクトし、 $1\mu\text{M}$  の sHN で処理した後、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

### 【図13】

ALS関連SOD1変異体により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

A: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションの効果の欠如。F11 細胞に、ALS関連変異 SOD1 (SOD1 の A4T、G85R、またはG93A 変異体) をコードする pEF-BOSを、空ベクター (pFLAG) 、または pHN と共にトランスフェクトした。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11 細胞に、A4T、G85R、またはG93A SOD1 をコードする pEF-BOSをトランスフェクトし、 $100\mu\text{M}$  の sHN、sHNG、または sHNA で処理した。その後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

### 【図14】

$\text{A}\beta$  により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す位相差顕微鏡像である。代表的な観察像を示した。初代培養皮質神経を、sHN ( $10\text{nM}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) 、 $10\text{nM}$  sHNG、または  $10\mu\text{M}$  sHNA の存在下または非存在下で  $25\mu\text{M}$  の  $\text{A}\beta$  1-43 で 72 時間処理した。 $\text{A}\beta$  1-43処理の開始16時間前に、図示した最終濃度のHNポリペプチドを1回添加した。 $\text{A}\beta$  1-43の添加は、まず培地の半分を除去し

、上記と同じ濃度のsHNまたはsHNAと50  $\mu$ MのA $\beta$  1-43とを含む新鮮な培地を除去した培地と等量補充することによって行った。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。

【図15】

A $\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した濃度のsHN、sHNG、またはsHNAの存在下または非存在下で25  $\mu$ MのA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$ 処理の開始から72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。これらの実験の際、ポジティブコントロールとして、初代培養神経を10  $\mu$ M sHNまたはHN誘導体の存在下または非存在下、20  $\mu$ Mのエトポサイドで72時間同様に処理した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

【図16】

A $\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。培養液中に放出されたLDH量により細胞傷害性をモニターした。初代培養皮質神経を、図示した濃度のsHN、sHNG、またはsHNAの存在下または非存在下で25  $\mu$ MのA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$ 処理開始の24、48、または72時間後に培養液中のLDH量を測定した。HNポリペプチドの存在下または非存在下で20  $\mu$ Mのエトポサイドで処理した神経からのLDH放出も測定した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

【図17】

A $\beta$  1-43により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。Calcein-AM染色の結果を示す蛍光顕微鏡像である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度のHNポリペプチドの存在下または非存在下で25  $\mu$ MのA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$  1-43処理の72時間後にCalcein-AMで染色を行った。細胞質における蛍光は生細胞であることを表す。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は代表的な結果を示す。

## 【図18】

Calcein-AM染色の蛍光測定の結果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度の HNポリペプチドの存在下または非存在下で  $25 \mu M$  のA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$  1-43処理の72時間後に Calcein-AM で染色を行い、蛍光強度を測定した。基底状態の蛍光強度は 36960 (unit/well) と計算され、これを各値から差し引いた。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

## 【図19】

ヒトの様々な組織中のHN mRNAの発現を示す図である。ヒト組織のポリA-RNAがプロットされたシートに放射標識したアンチセンスHN (a)、5'領域をコードする19mer (b)、またはDT77 (c) をプローブとしてハイブリダイズさせた (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:大腸、5:胸腺、6:脾臓、7:腎臓、8:肝臓、9:小腸、10:肺臓、11:肺、12:末梢血白血球)。 (d) は同じシートを、 $\beta$ -actinをプローブにしてノーザンプロットを行った結果を示す。左側の数字は分子量サイズを示す。同様の実験は少なくとも3回行い、これと同様の結果を得た。

## 【図20】

マウス組織でのHN mRNAの発現を示す図である。マウスの様々な器官から抽出したポリA-RNA ( $2 \mu g$  / レーン) を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、プロット後、標識したアンチセンスHN (左上) または $\beta$ -actin (左下) をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:胸腺、5:脾臓、6:腎臓、7:肝臓、8:小腸、9:胃、10:皮膚、11:肺)。

右のパネルはマウス脳におけるHN mRNAの発現領域を示す図である。マウス脳の様々な領域由来のポリA-RNAがプロットされたシート (1:前頭葉、2:側頭葉、3:頭頂葉、4:後頭葉、5:小脳、6:肺) に、標識したアンチセンスHN (右上) または $\beta$ -actin (右下) プローブをハイブリダイズさせた。シート間で量的な比較ができるように、左パネルと同じ量の肺由来のポリA-RNAをレーン6に泳動してハイブリダイゼーションを行った。

## 【図21】

HNの防御活性における構造／機能関係の詳細な解析結果を示す図である。図は V642I APP により誘導される神経細胞の細胞死におけるHN欠失誘導体の効果を示す。図9に示したように、各合成HN誘導体の存在下または非存在下で F11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。左上のパネルは、図示したようなN末端欠失HNの試験結果を示す。右上のパネルは、図示したような、 $\Delta N2$  HNのC末端欠失ポリペプチドの試験結果を示す。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。このパネルに示された実験により得られた結果を下のパネルにまとめた。

### 【図22】

4種の異なるFAD遺伝子により引き起こされる神経細胞死における  $\Delta N3$  HNおよび HN-17 の効果を示す図である。10  $\mu$ M の $\Delta N3$  HNまたは HN-17 の存在下または非存在下、F11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクトし、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した（左上パネル）。右上のパネルと下のパネルは、FAD遺伝子による神経細胞死の抑制における HN-17 の効果の用量-応答曲線を示す。図のように段階的に濃度を増加させた合成HN-17の存在下または非存在下で、F11細胞に各FAD遺伝子（V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNA）を同様にしてトランスフェクトした。72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。「no Tx」はFAD遺伝子をトランスフェクションしていない細胞の結果。各図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

### 【図23】

4種の異なるFAD遺伝子および $\text{A}\beta$  1-43により引き起こされる神経細胞死に対する HNG-17のAla置換体（Ala-scanned HNG-17）の効果を示す図である。10nM のAla置換された HNG-17 の存在下または非存在下、初代培養神経を 25  $\mu$ Mの $\text{A}\beta$  1-43で処理（左上パネル）するか、またはF11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクト（他のパネル）し、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。それぞれのAla置換 HNG-17 で細胞死アンタゴナיז効果の検出を行った。置換残基はグラフの下に示している。それぞれのAla置換体のアミノ酸配列は、順に配列番号：25～41に

示した。例えば、左上パネルにおいて、10nM の ARGFSCLLLTGEUDLP（下線を引いたAはPから置換された）（配列番号：25）の存在下で初代培養神経を 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$  1-43で72時間インキュベートした場合、細胞死の比率は 75.3±4.4%（3回の独立した実験の平均±S.D.）で、 $\text{A}\beta$  1-43によるインキュベーションにおける細胞死の比率（76.1±4.7%）と同等であった。10nM の HNG または HNG-17 の存在下で神経を 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$  1-43とインキュベートした場合は、細胞死の比率はそれぞれ 29.3±0.9% または 28.8±1.3% であり、基底状態における細胞死の比率（30.0±1.6%）と同等であった。「no T」はFAD遺伝子をトランスフェクションしていない細胞、「vec」は空ベクターをトランスフェクトした細胞、「no」はポリペプチドで処理していない細胞の結果を示す。各図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

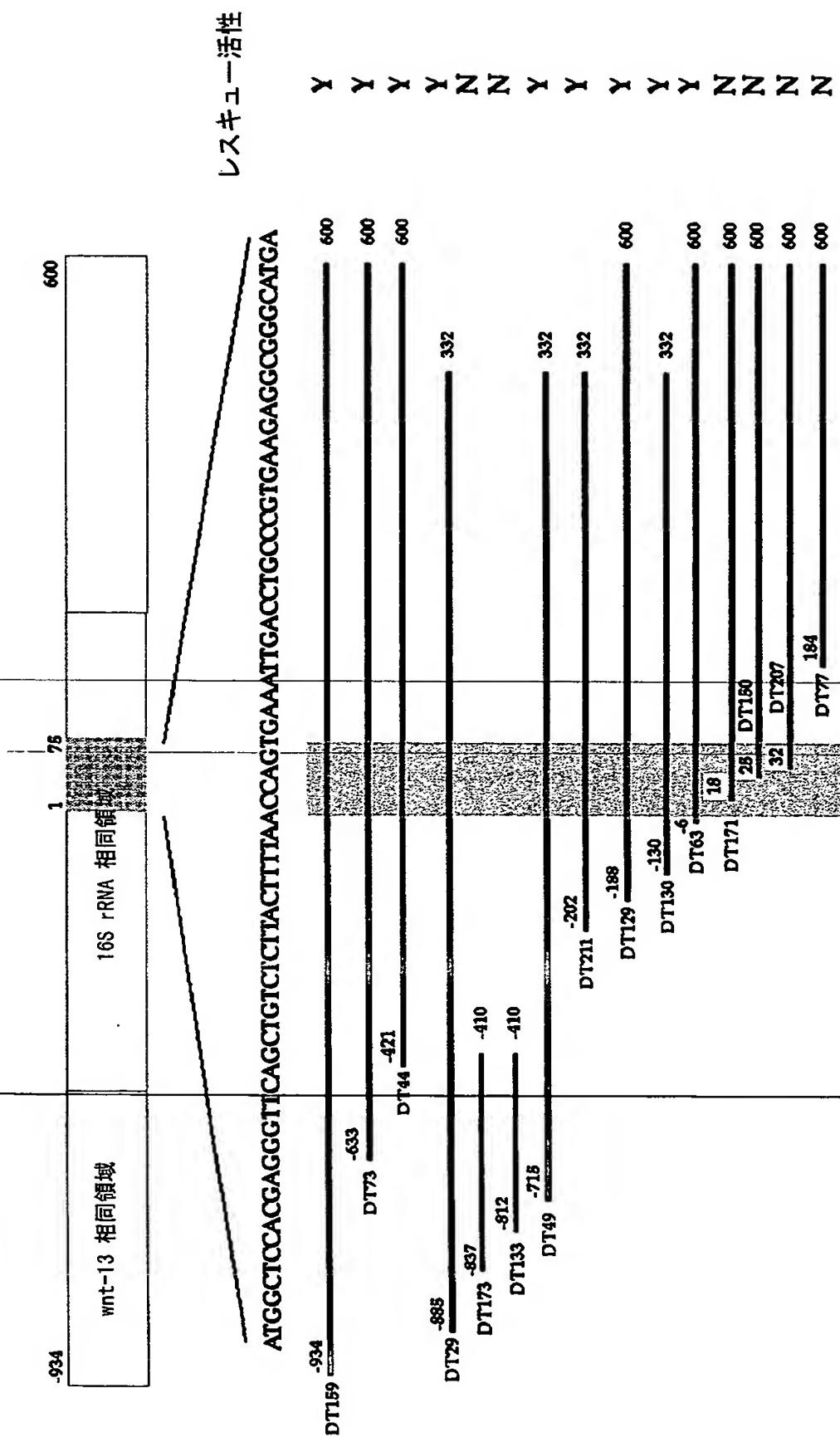
## 【図24】

4種の異なるFAD遺伝子および $\text{A}\beta$  1-43により引き起こされる神経細胞死に対する AGA-HNG（配列番号：42）の効果を示す図である。様々な濃度の AGA-HNG の存在下または非存在下、初代培養神経を 25  $\mu$ Mの $\text{A}\beta$  1-43で処理（パネルB）するか、またはF11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクト（パネルC～F）し、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。 $\text{A}\beta$  を用いた初代培養神経の実験においては、コントロールとして様々な濃度の HNG を用いて同様の実験を行った。「no T」はトランスフェクションしていない細胞、「pcDNA」は空ベクターをトランスフェクトした細胞の結果である。各パネルは全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

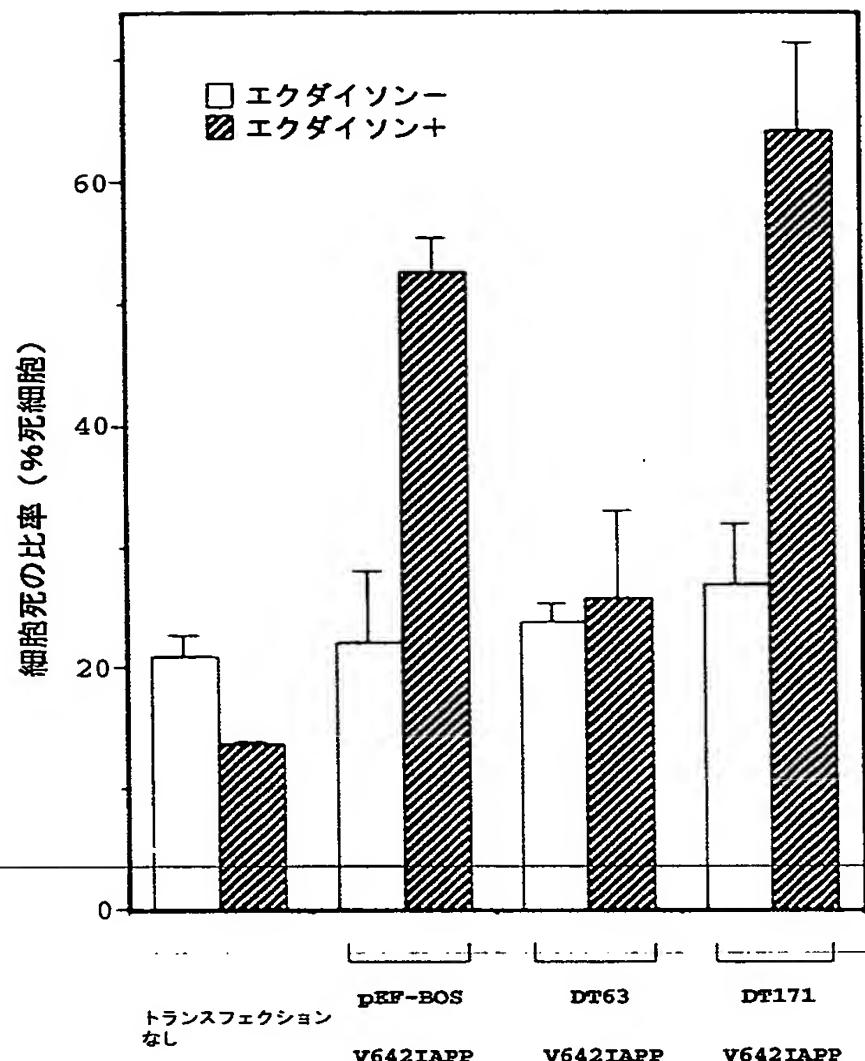
【書類名】

図面

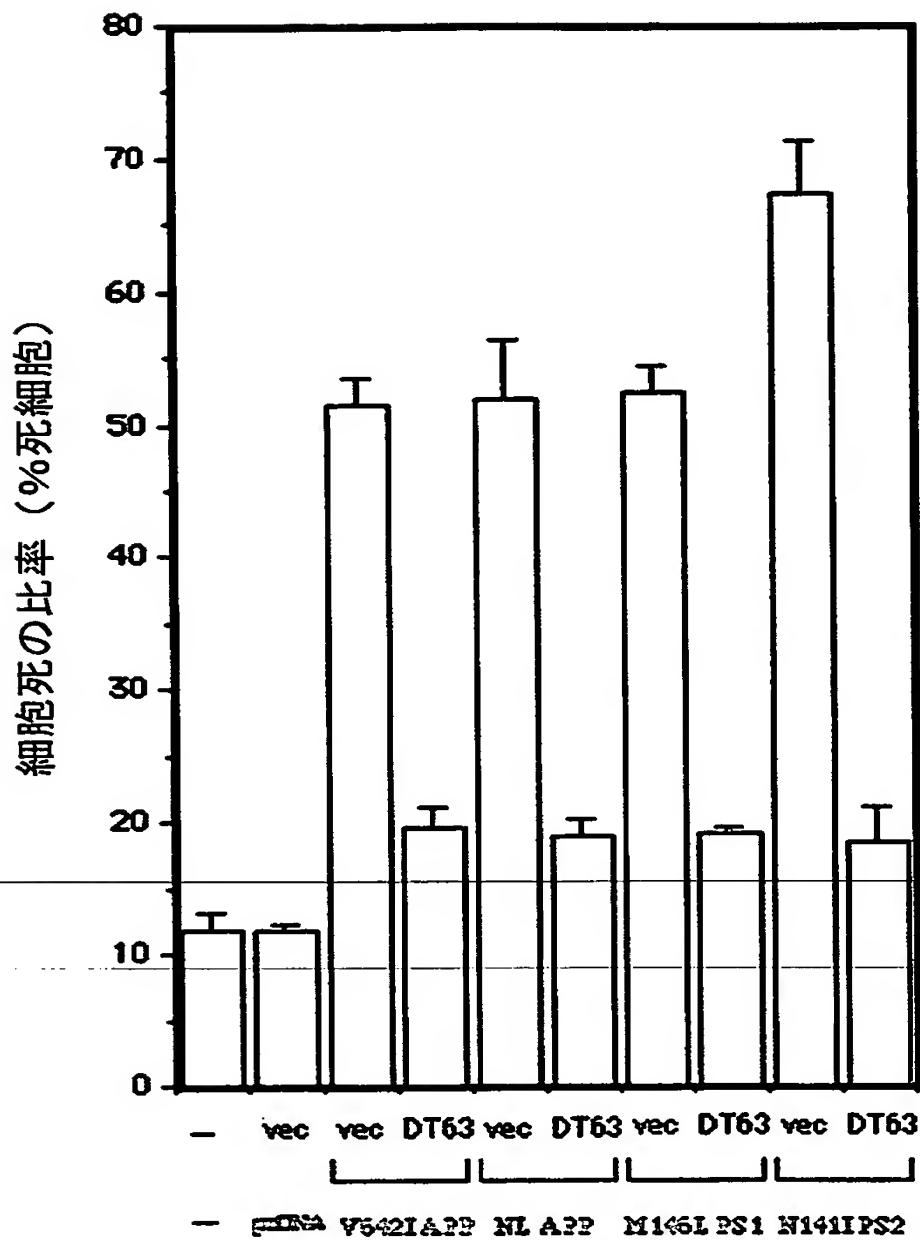
【図1】



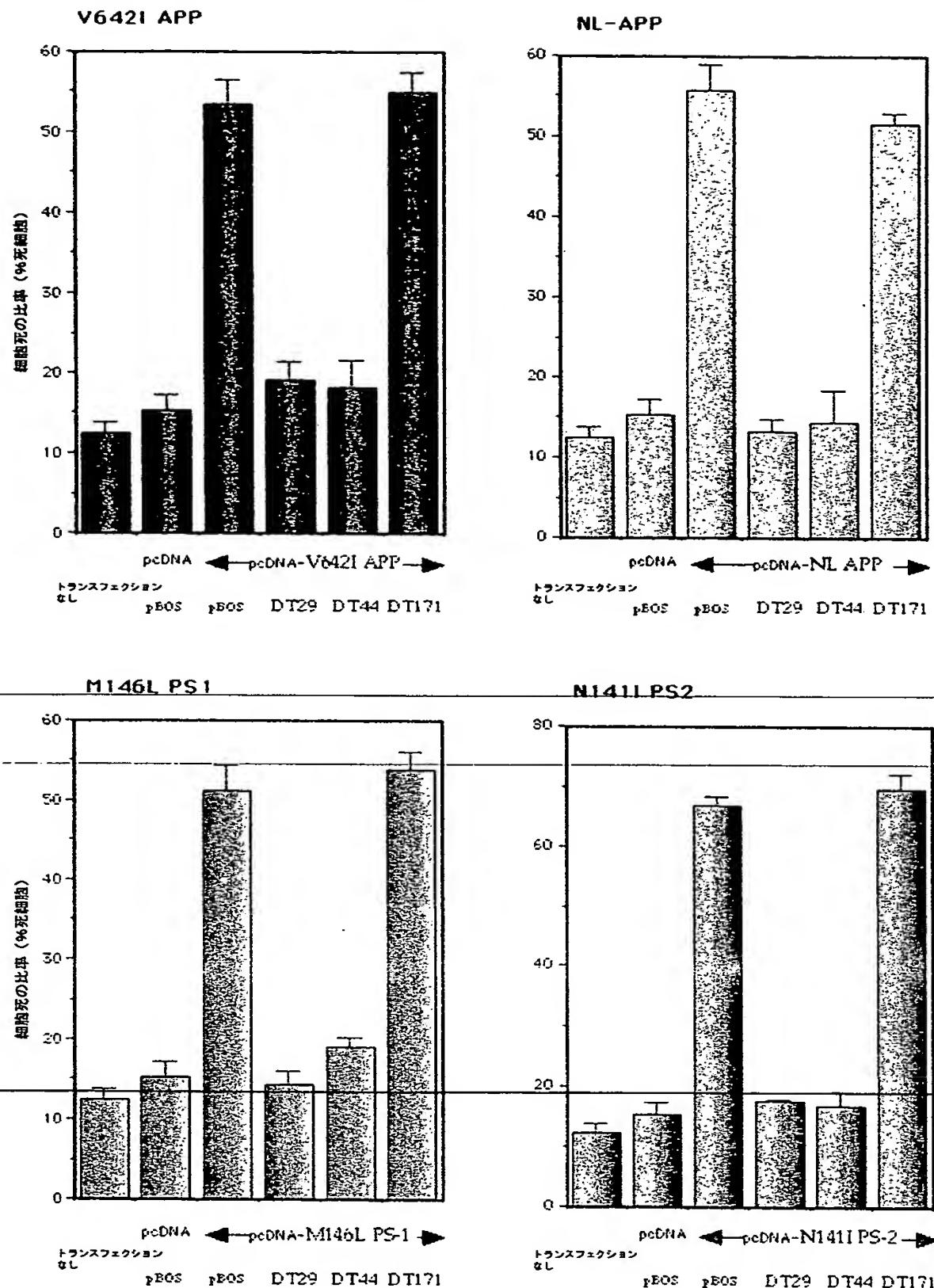
【図2】



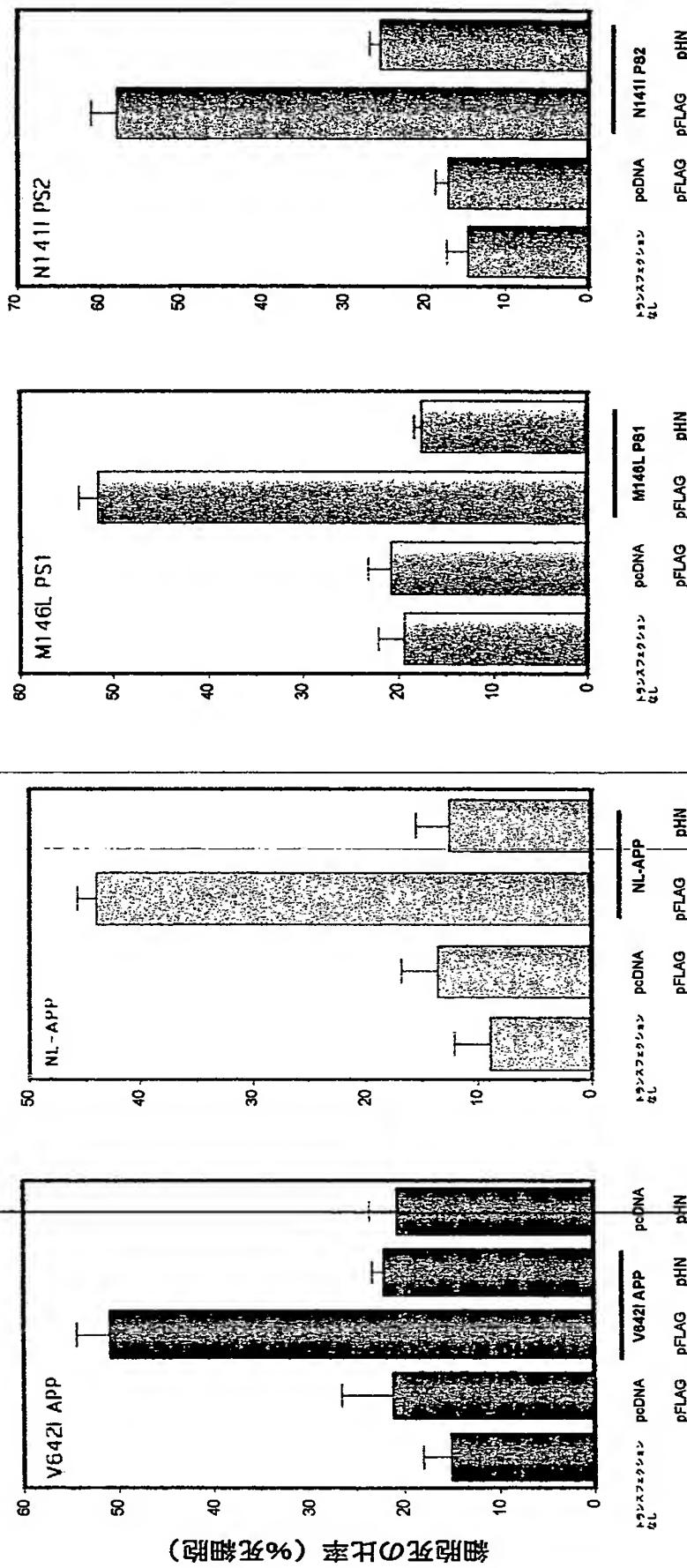
【図3】



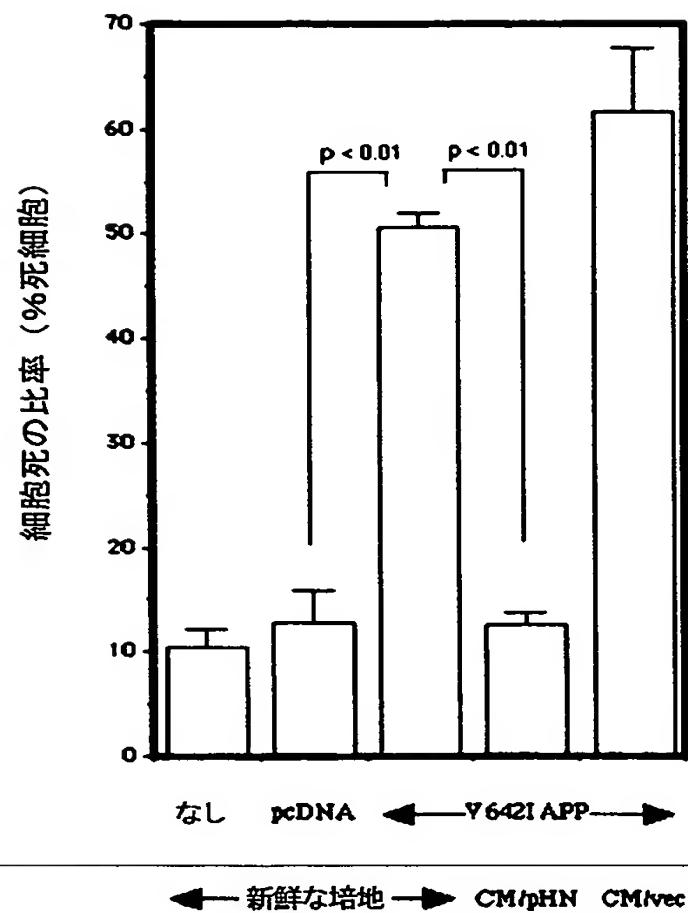
【図4】



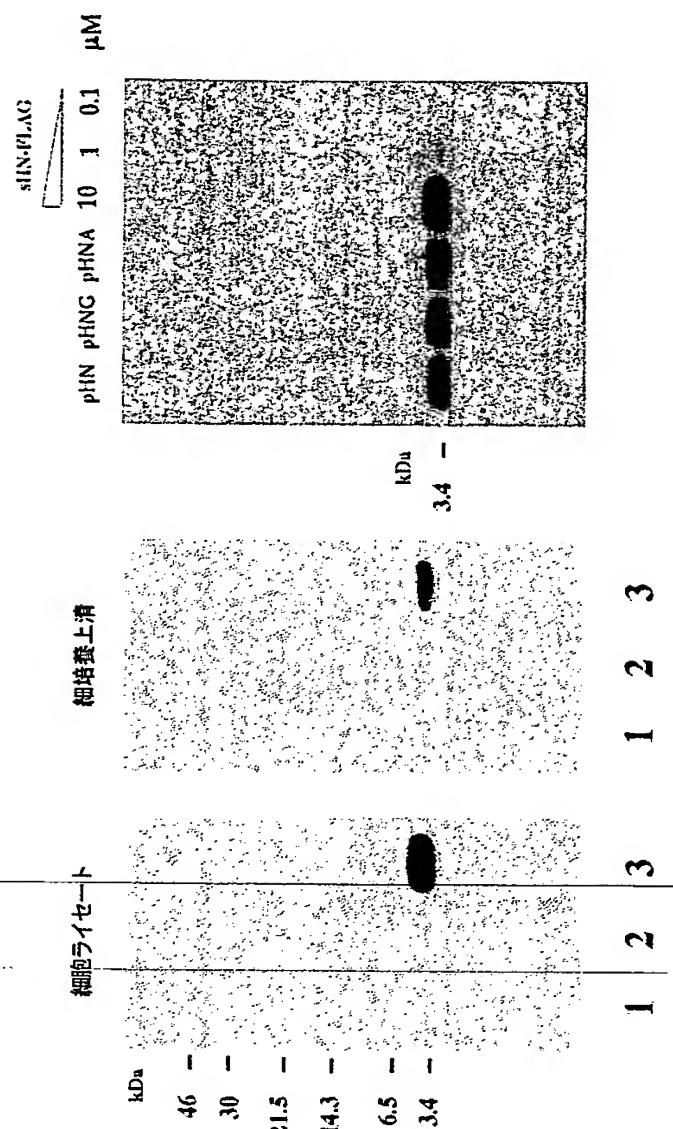
【図5】



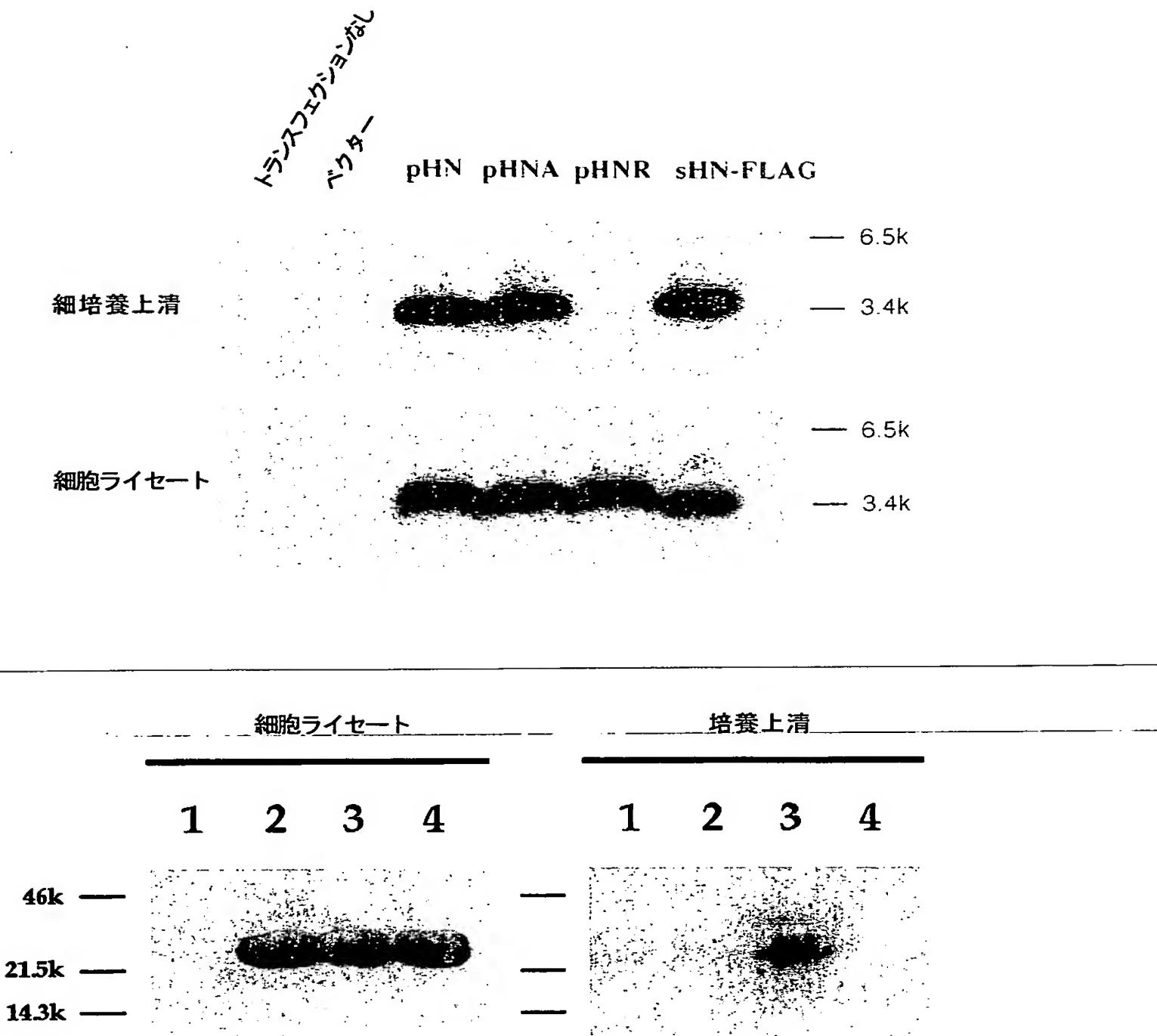
【図6】



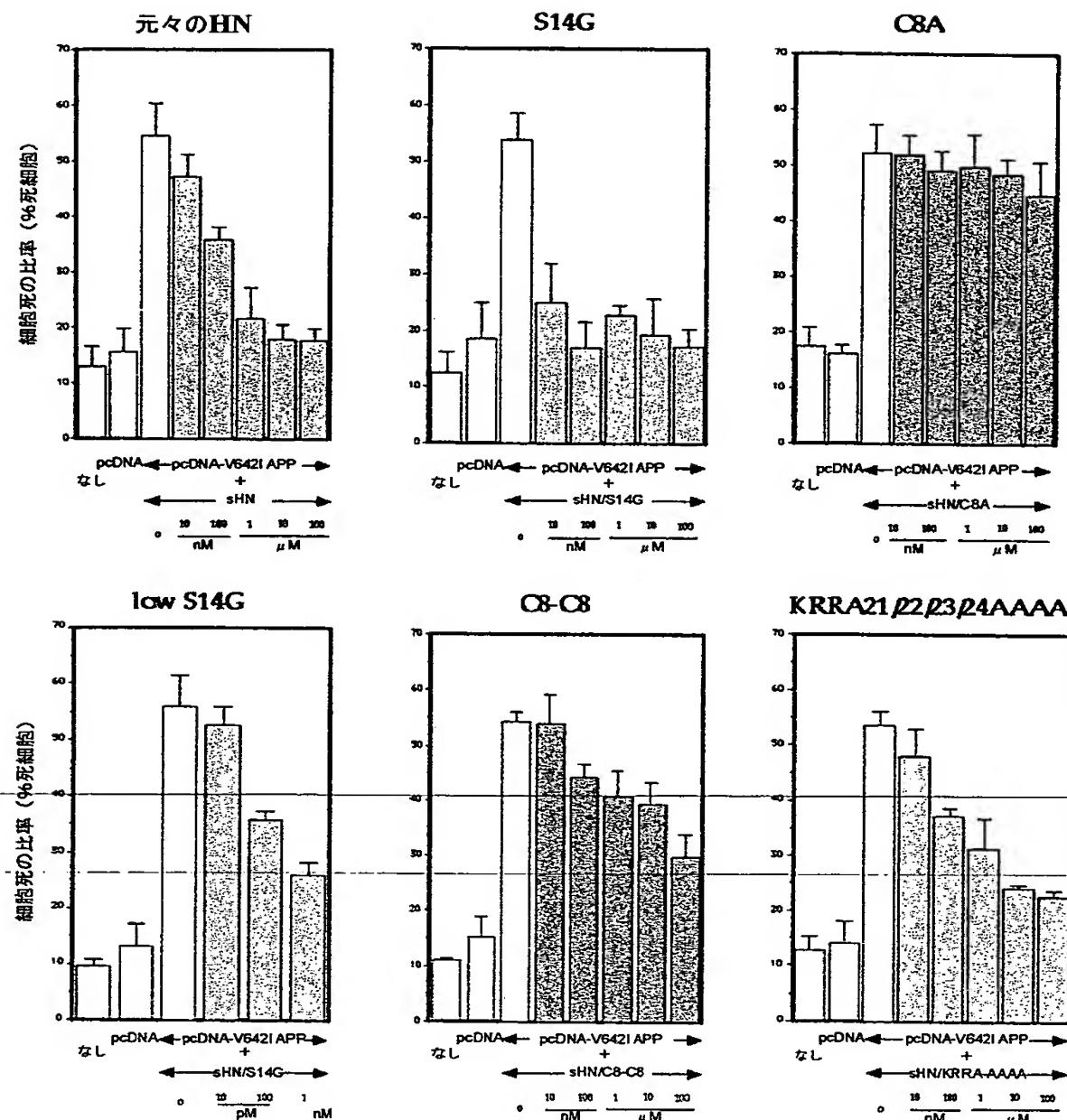
【図7】



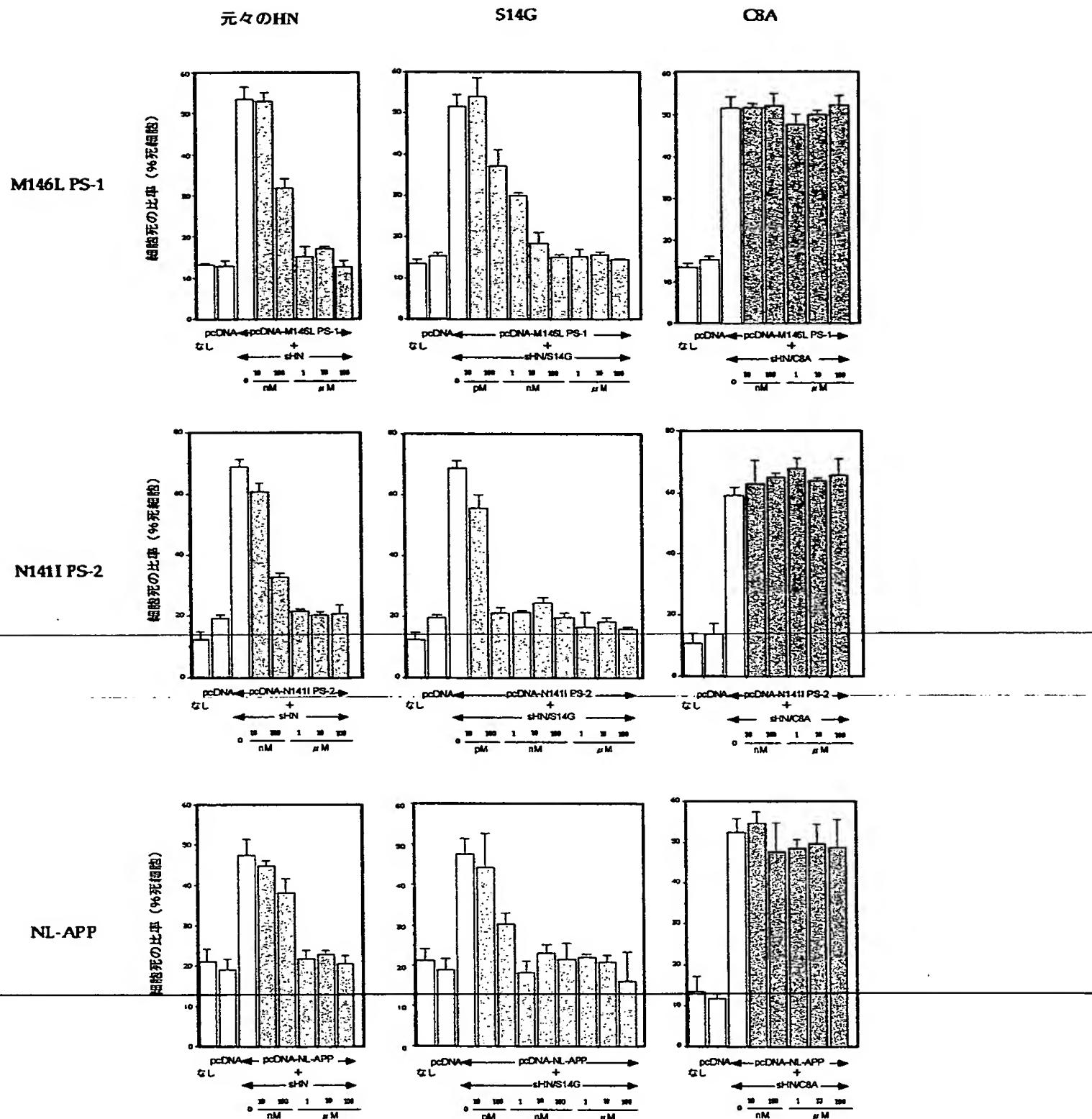
【図8】



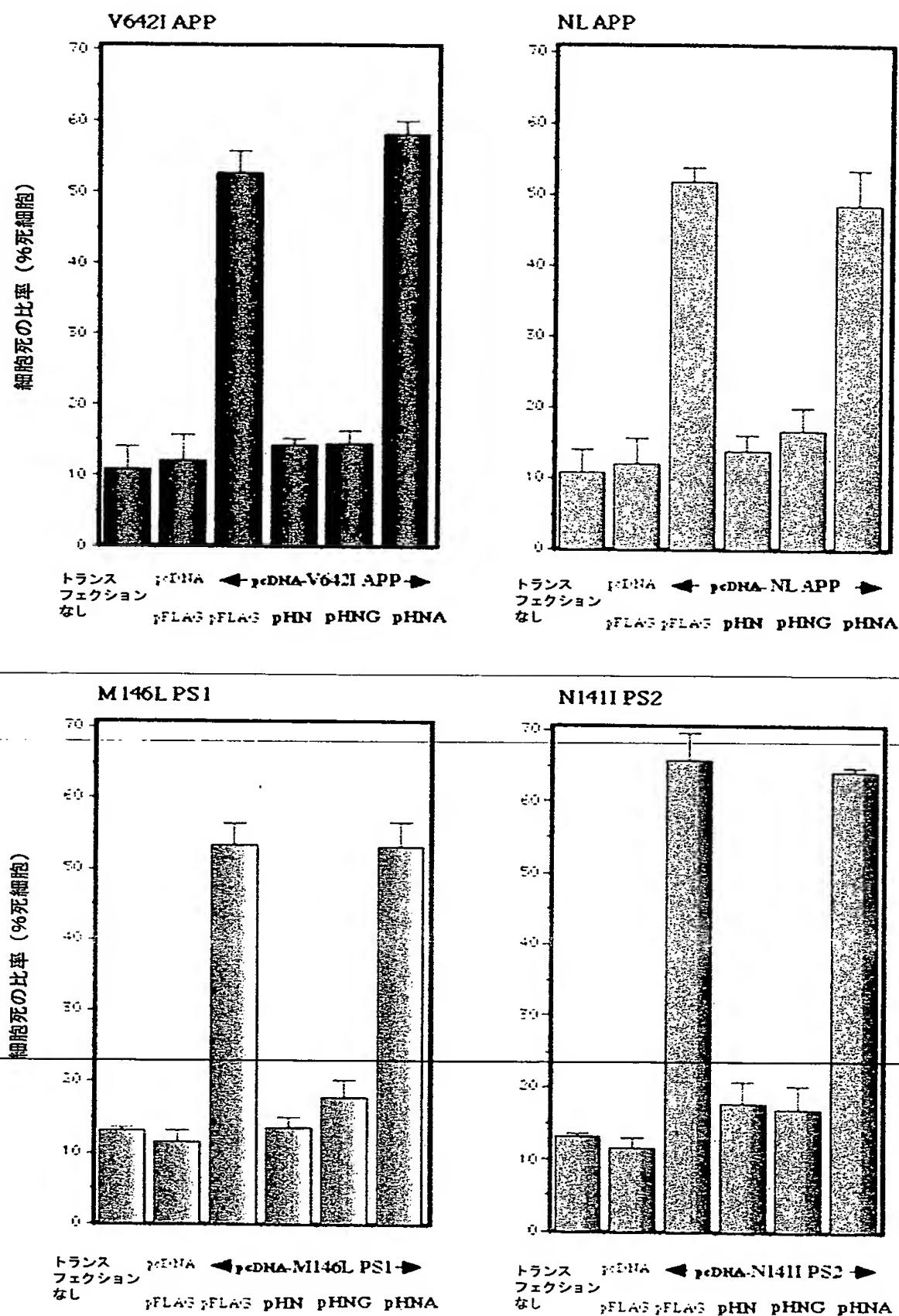
【図9】



【図10】

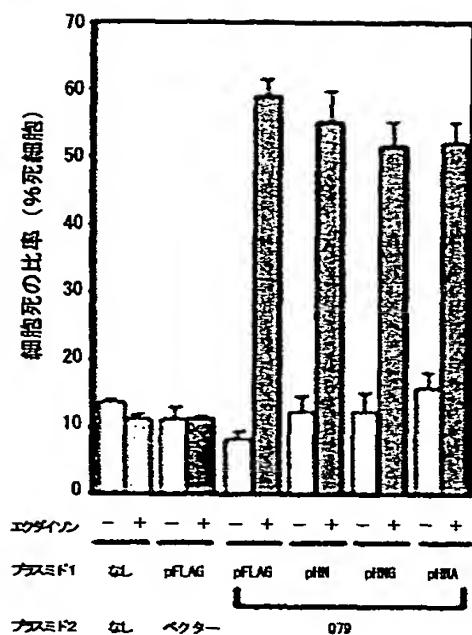


【図11】

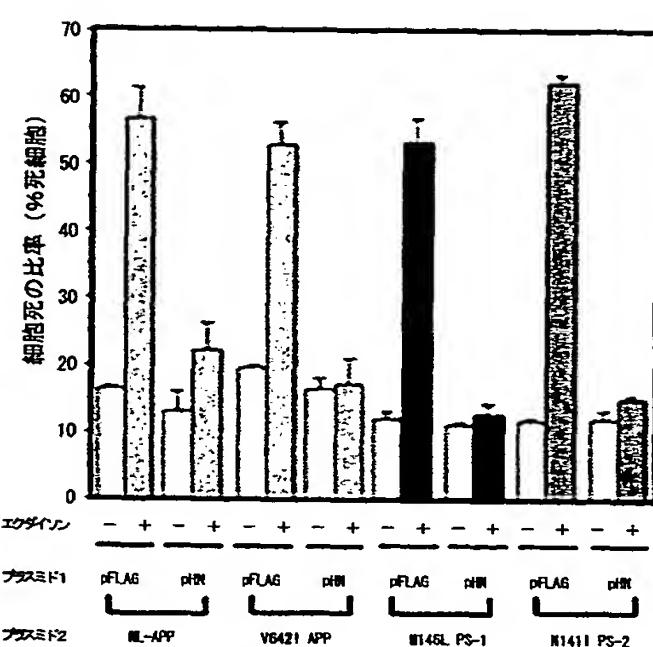


【図12】

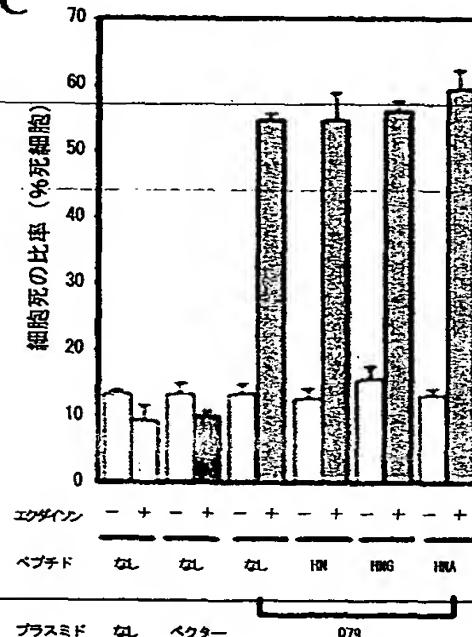
A



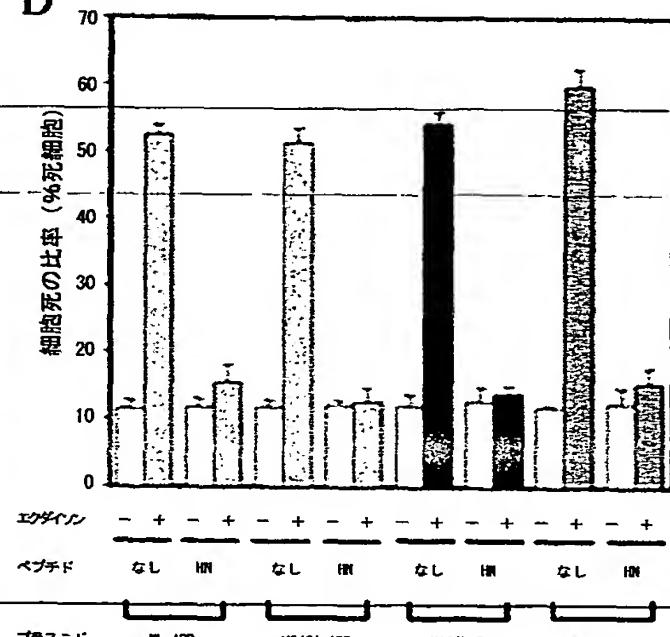
B



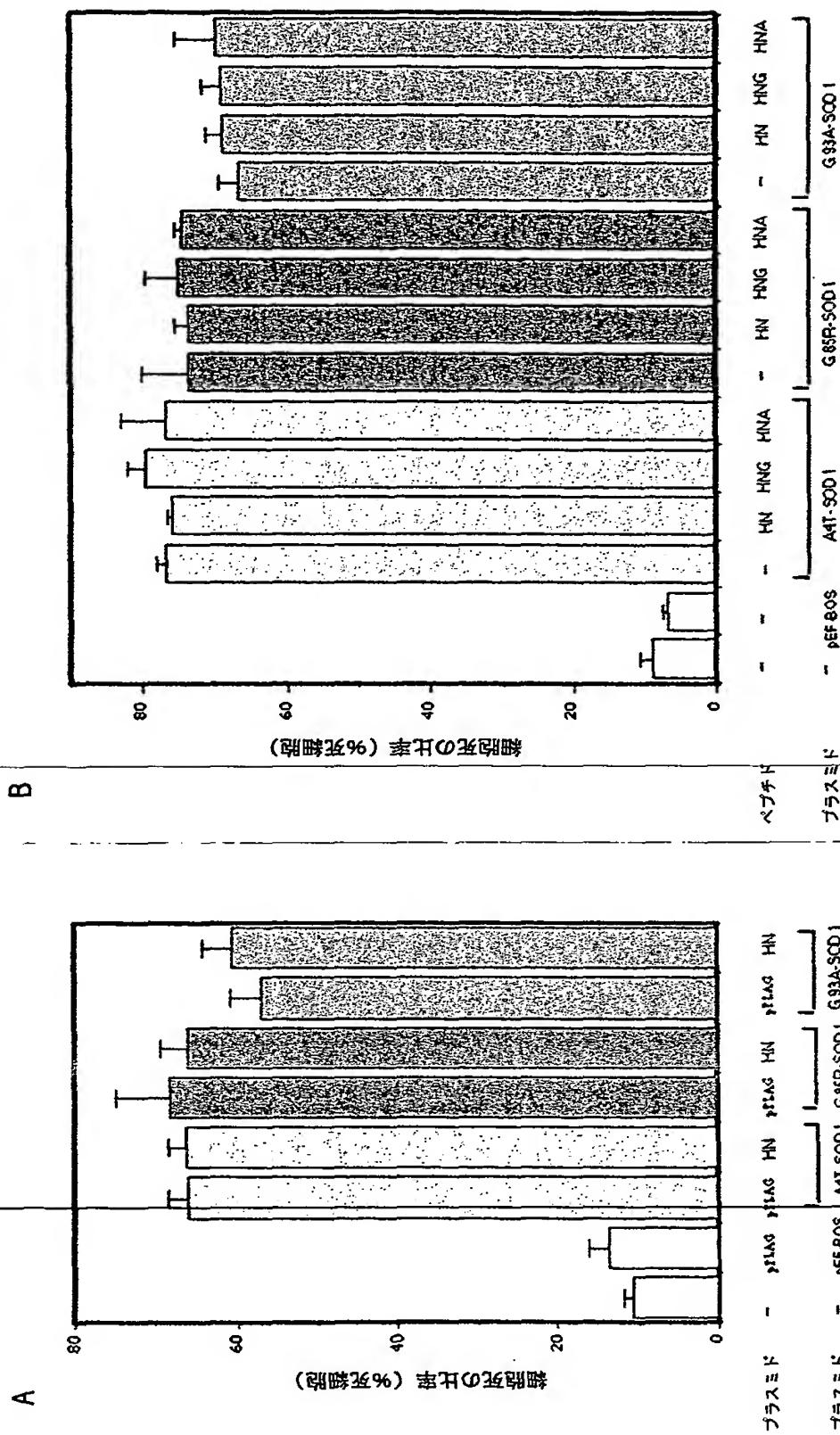
C



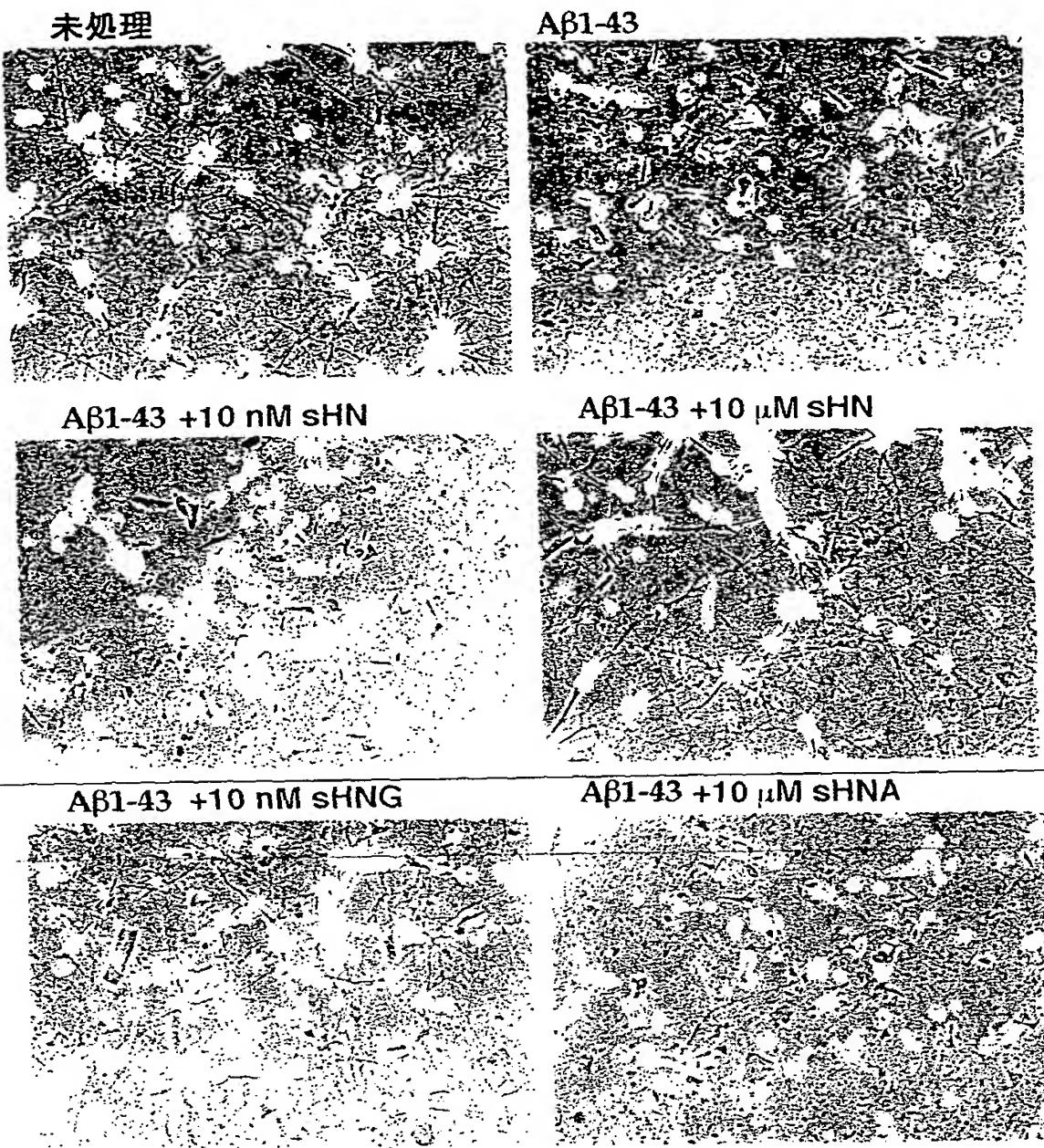
D



【図13】



【図14】



1

5

10

15

Pro

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 40

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Ala

1

5

10

15

Pro

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially  
synthesized sequence

<400> 41

Pro Arg Gly Phe Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile Asp Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 42

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 42

Met Ala Pro Ala Gly Ala Ser Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Glu Ile

1

5

10

15

Asp Leu Pro Val Lys Arg Arg Ala

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

Humanin cDNA クローンにおける、V642I APPによる細胞死をアンタゴナイズする活性をコードする領域を示す図である。

DNA断片を、最も長い配列（-934から600；1番目の塩基は Humanin ORF の最初の塩基に対応し、その1塩基前は -1 である）に対して整列させた。V642I APP により誘導される F11/EcR 細胞の細胞死に対するそれらの活性を横に示す。F11/EcR 細胞に V642I APP をコードする pIND (1 μg) と共に、1 μgの pEF-BOS またはそれぞれのDNA断片をコードする pEF-BOS を3時間トランスフェクトし、続いてエクダイソンで72時間処理した。トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。pEF-BOS をトランスフェクトした細胞とそれぞれのDNA断片をトランスフェクトした細胞との間で、細胞死に統計的に有意な差があった場合、このDNA断片にはアンタゴナイズ活性があると判定し、"Y"で示した。"N"は有意なアンタゴナイズ活性がなかったことを示す。

#### 【図2】

エクダイソンにより誘導される V642I APP の発現による神経細胞死における DT63 と DT171 クローンの効果を示す図である。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 V642I APP プラスミドと共に、pEF-BOS、DT63、またはDT171 (DT63とD171は pEF-BOS にクローン化されている) をトランスフェクトし、Ponasterone (エクダイソン) 処理を行った。エクダイソン処理を行わない群も設定した。エクダイソン処理の 72 時間後、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。また、エクダイソン処理を行わない群も同様に測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。DT63とDT171は図1に示されている。

#### 【図3】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における DT63 クローンの効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (vec) または DT63 をコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。図中のエラーバーのある数値は、3回の独立したトランスフェクションの結果の平均±S.D.を表す。

#### 【図4】

FAD遺伝子のトランスフェクションによる F11 細胞の細胞死における DT29、D

T44、および DT171 クローンの効果を示す図である。図3と同様に、F11細胞に pcDNA または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pEF-BOS (pBOS) または DT クローンをコードする pEF-BOS をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。DT29とDT44は図1に示されている。3つの実験を同時に行つたところ、ベーサルな細胞死の比率（トランスフェクションなし、pcDNA+pBOS）は共通していた。同様の実験は少なくとも3回行つた。図中のエラーバーのある数値は平均±S.D.を表す。

#### 【図5】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞死における、Humaninをコードするプラスミド pHN の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN) をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。

#### 【図6】

V642I APPにより誘導される神経細胞死における、pHN をトランスフェクトしたF11細胞からの培養上清の抑制効果を示す図である。F11細胞に pcDNA または V642I APPをコードする pcDNA を血清非存在下で3時間トランスフェクトし、18%FBSを含む HamF-12 で2時間培養した後、CM/F11-pHN (CM/pHN) 、CN/F11-vec (CM/vec) 、または新鮮な培地 (18%FBSを含む新しい HamF-12) で67時間培養した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。値は3回の独立した実験結果の平均±S.D.を表す。p<0.01 は Student のt検定による。

#### 【図7】

pHNをトランスフェクトしたF11細胞の培養上清に含まれる HN ポリペプチドの免疫反応性を示す図である。左と中央のパネルは、細胞抽出液 (30 μg protein) および培養上清 (20 μl) をTris/Tricineゲル電気泳動後、抗FLAG抗体を用いたイムノブロットを行つた結果を示す (1: トランスフェクションなしの細胞；

2: pFLAGをトランスフェクトした細胞； 3: pHNをトランスフェクトした細胞)。右のパネルは、pHN、pHNG、またはpHNAをトランスフェクトした細胞の培養上清を同様に解析した結果である。右の3レーンは、培養上清中に含まれるHNポリペプチドのタイマーを決定するために、図示した濃度のsHN-FLAG (MAPRGFSCL LLLTSEIDL DVKRRAGTDYKDDDDK : 下線はFLAGタグ) (配列番号：6) のイムノプロットを行った結果を示す。同様の実験は4回以上繰り返した。

#### 【図8】

上パネル：L9R変異によりHNが細胞外に分泌されなくなることを示す図である。F11細胞にpHN、pHNA、またはpHNR (L9R HNをコードするpFLAG)をトランスフェクトし、72時間後に細胞抽出液および培養上清を回収し、図7と同様に抗FLAG抗体を用いて解析した。

下パネル：HNのシグナル配列様分泌活性を示す図である。EGFP cDNA (レーン2)、HN-EGFP融合cDNA (レーン3)、またはHNR-EGFP cDNA (レーン4)をF11細胞にトランスフェクトし、72時間後に細胞抽出液 (左下パネル, 10 μg/レーン) または培養上清 (右下パネル, 20 μg/レーン)を抗EGFPポリクローナル抗体 (1/200) およびHRP結合抗ウサギIgG抗体 (1/5000)を用いたイムノプロットにより解析した。両パネルのレーン1はトランスフェクションを行わなかったF11細胞由來の資料をプロットした結果を示す。左のバーに分子量をダルトンで示した。

#### 【図9】

V642I APPにより誘導される神経細胞死における、合成HN (sHN) およびその構造的誘導体の効果を示す図である。F11細胞にV642I APPをコードするpcDNAをトランスフェクトし、様々な濃度のsHN (元々のHN) (配列番号：5)、sHNG (S14G) (配列番号：8)、sHNA (C8A) (配列番号：9)、C8を介したsHNのダイマー型 (C8-C8)、およびC末のKRRAをAAAAに置換したsHN (KRRA21/22/23/24AAAA) (配列番号：10)で処理した。トランスフェクション72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

#### 【図10】

M146L PS-1、N141I PS-2、またはNL-APPにより誘導される神経細胞死における

る sHN、sHNG、または sHNA の効果を示す図である。図9と同様に、M146L PS-1、N141I PS-2、または NL-APP cDNA をトランスフェクトした F11 細胞を、様々な濃度の sHN (元々の HN)、sHNG (S14G)、または sHNA (C8A) で処理した。トランスフェクション 72時間後に、トリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

## 【図11】

FAD遺伝子の発現により誘導される神経細胞における pHN、pHNG、または pHNA の効果を示す図である。F11細胞に空ベクター (pcDNA) または V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、もしくは N141I PS-2をコードする pcDNA と共に、pFLAG または HN をコードする pFLAG (pHN、pHNG、または pHNA) をトランスフェクトし 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

## 【図12】

ポリグルタミンリピート Q79 により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

A: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHN、pHNG、または pHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型 Q79 発現プラスミドと共に、空ベクター (pFLAG)、または pHN、pHNG、もしくは pHNAをトランスフェクトし、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、pHNのコトランスフェクションによる有意な抑制効果。A と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドと共に、pFLAG または pHN をトランスフェクトし、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で 72時間培養した。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

C: エクダイソンで誘導される Q79 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11/EcR 細胞に、エクダイソ

ン誘導型 Q79 プラスミドをトランスフェクトし、 $1\mu\text{M}$  の sHN、sHNG、または sHNA で処理し、その後エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

D: エクダイソンで誘導される NL-APP、V642I APP、M146L PS-1、または N141 I PS-2 の発現により引き起こされる神経細胞死における、sHNの有意な抑制効果。C と同じ条件で、F11/EcR 細胞に、エクダイソン誘導型FAD遺伝子プラスミドをトランスフェクトし、 $1\mu\text{M}$  のsHNで処理した後、エクダイソン存在下(+)または非存在下(-)で培養した。エクダイソン処理開始の72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図13】

ALS関連SOD1変異体により誘導される神経細胞死におけるHNおよびその構造的誘導体の効果の欠如を示す図である。図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

A: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、pHNのコトランスクレプションの効果の欠如。F11 細胞に、ALS関連変異 SOD1 (SOD1 の A4T、G85R、またはG93A 変異体) をコードする pEF-BOSを、空ベクター (pFLAG) 、または pHN と共にトランスフェクトした。細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

B: ALS関連SOD1変異体の発現により誘導される神経細胞死における、sHN、sHNG、または sHNA の効果の欠如。F11 細胞に、A4T、G85R、またはG93A SOD1 をコードする pEF-BOSをトランスフェクトし、 $100\mu\text{M}$  の sHN、sHNG、または sHNA で処理した。その後、細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。

【図14】

$\text{A}\beta$  により誘導される初代培養神経の細胞死における HN の効果を示す位相差顕微鏡像である。代表的な観察像を示した。初代培養皮質神経を、sHN ( $10\text{nM}$ ,  $10\mu\text{M}$ ) 、 $10\text{nM}$  sHNG、または  $10\mu\text{M}$  sHNA の存在下または非存在下で  $25\mu\text{M}$  の  $\text{A}\beta 1-43$  で 72 時間処理した。 $\text{A}\beta 1-43$ 処理の開始16時間前に、図示した最終濃度のHNポリペプチドを1回添加した。 $\text{A}\beta 1-43$ の添加は、まず培地の半分を除去し

- 、上記と同じ濃度のsHNまたはsHNAと50  $\mu$ MのA $\beta$  1-43とを含む新鮮な培地を除去した培地と等量補充することによって行った。同様の実験は少なくとも3回行い
- 、再現性のある結果を得た。

## 【図15】

A $\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した濃度のsHN、sHNG、またはsHNAの存在下または非存在下で25  $\mu$ MのA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$ 処理の開始から72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。これらの実験の際、ポジティブコントロールとして、初代培養神経を10  $\mu$ M sHNまたはHN誘導体の存在下または非存在下、20  $\mu$ Mのエトボサイドで72時間同様に処理した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均士S.D.を示す。

## 【図16】

A $\beta$ により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。培養液中に放出されたLDH量により細胞傷害性をモニターした。初代培養皮質神経を、図示した濃度のsHN、sHNG、またはsHNAの存在下または非存在下で25  $\mu$ MのA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$ 処理開始の24、48、または72時間後に培養液中のLDH量を測定した。HNポリペプチドの存在下または非存在下で20  $\mu$ Mのエトボサイドで処理した神経からのLDH放出も測定した。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均士S.D.を示す。

## 【図17】

A $\beta$  1-43により誘導される初代培養神経の細胞死におけるHNの効果を示す図である。Calcein-AM染色の結果を示す蛍光顕微鏡像である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度のHNポリペプチドの存在下または非存在下で25  $\mu$ MのA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$  1-43処理の72時間後にCalcein-AMで染色を行った。細胞質における蛍光は生細胞であることを表す。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は代表的な結果を示す。

## 【図18】

Calcein-AM染色の蛍光測定の結果を示す図である。初代培養皮質神経を、図示した最終濃度の HNポリペプチドの存在下または非存在下で  $25\mu M$  のA $\beta$  1-43を添加した。HNポリペプチドの添加は図14と同様に行った。A $\beta$  1-43処理の72時間後に Calcein-AM で染色を行い、蛍光強度を測定した。基底状態の蛍光強度は 36960 (unit/well) と計算され、これを各値から差し引いた。同様の実験は少なくとも3回行い、再現性のある結果を得た。図は3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

## 【図19】

ヒトの様々な組織中のHN mRNAの発現を示す図である。ヒト組織のポリA-RNAがプロットされたシートに放射標識したアンチセンスHN (a)、5'領域をコードする19mer (b)、またはDT77 (c) をプローブとしてハイブリダイズさせた (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:大腸、5:胸腺、6:脾臓、7:腎臓、8:肝臓、9:小腸、10:肺臓、11:肺、12:末梢血白血球)。 (d) は同じシートを、 $\beta$ -actinをプローブにしてノーザンプロットを行った結果を示す。左側の数字は分子量サイズを示す。同様の実験は少なくとも3回行い、これと同様の結果を得た。

## 【図20】

マウス組織でのHN mRNAの発現を示す図である。マウスの様々な器官から抽出したポリA-RNA ( $2\mu g$  / レーン) を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、プロット後、標識したアンチセンスHN (左上) または $\beta$ -actin (左下) をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った (1:脳、2:心臓、3:骨格筋、4:胸腺、5:脾臓、6:腎臓、7:肝臓、8:小腸、9:胃、10:皮膚、11:肺)。

右のパネルはマウス脳におけるHN mRNAの発現領域を示す図である。マウス脳の様々な領域由来のポリA-RNAがプロットされたシート (1:前頭葉、2:側頭葉、3:頭頂葉、4:後頭葉、5:小脳、6:肺) に、標識したアンチセンスHN (右上) または $\beta$ -actin (右下) プローブをハイブリダイズさせた。シート間で量的な比較ができるように、左パネルと同じ量の肺由来のポリA-RNAをレーン6に泳動してハイブリダイゼーションを行った。

## 【図21】

HNの防御活性における構造／機能関係の詳細な解析結果を示す図である。図は V642I APP により誘導される神経細胞の細胞死におけるHN欠失誘導体の効果を示す。図9に示したように、各合成HN誘導体の存在下または非存在下で F11細胞に V642I APP cDNA をトランスフェクトし、72時間後に細胞死をトリパンブルー排除アッセイにより測定した。左上のパネルは、図示したようなN末端欠失HNの試験結果を示す。右上のパネルは、図示したような、 $\Delta$ N2 HNのC末端欠失ポリペプチドの試験結果を示す。3回の独立した実験の平均士S.D.を示す。このパネルに示された実験により得られた結果を下のパネルにまとめた。

### 【図22】

4種の異なるFAD遺伝子により引き起こされる神経細胞死における  $\Delta$ N3 HNおよび HN-17 の効果を示す図である。10  $\mu$ M の $\Delta$ N3 HNまたは HN-17 の存在下または非存在下、F11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクトし、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した（左上パネル）。右上のパネルと下のパネルは、FAD遺伝子による神経細胞死の抑制における HN-17 の効果の用量-応答曲線を示す。図のように段階的に濃度を増加させた合成HN-17の存在下または非存在下で、F11細胞に各FAD遺伝子（V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNA）を同様にしてトランスフェクトした。72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。「no Tx」はFAD遺伝子をトランスフェクションしていない細胞の結果。各図は全て3回の独立した実験の平均士S.D.を示す。

### 【図23】

4種の異なるFAD遺伝子および $\text{A}\beta$  1-43により引き起こされる神経細胞死に対する HNG-17のAla置換体（Ala-scanned HNG-17）の効果を示す図である。10nM のAla置換された HNG-17 の存在下または非存在下、初代培養神経を 25  $\mu$ Mの $\text{A}\beta$  1-43で処理（左上パネル）するか、またはF11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクト（他のパネル）し、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。それぞれのAla置換 HNG-17 で細胞死アンタゴナיז効果の検出を行った。置換残基はグラフの下に示している。それぞれのAla置換体のアミノ酸配列は、順に配列番号：25～41に

示した。例えば、左上パネルにおいて、10nM の ARGFSCLLLTGEUDLP (下線を引いたAはPから置換された) (配列番号：25) の存在下で初代培養神経を 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$  1-43で72時間インキュベートした場合、細胞死の比率は 75.3±4.4% (3回の独立した実験の平均±S.D.) で、 $\text{A}\beta$  1-43によるインキュベーションにおける細胞死の比率 (76.1±4.7%) と同等であった。10nM の HNG または HNG-17 の存在下で神経を 25  $\mu$ M  $\text{A}\beta$  1-43とインキュベートした場合は、細胞死の比率はそれぞれ 29.3±0.9% または 28.8±1.3% であり、基底状態における細胞死の比率 (30.0±1.6%) と同等であった。「no T」はFAD遺伝子をトランスフェクションしていない細胞、「vec」は空ベクターをトランスフェクトした細胞、「no」はポリペプチドで処理していない細胞の結果を示す。各図は全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

## 【図24】

4種の異なるFAD遺伝子および $\text{A}\beta$  1-43により引き起こされる神経細胞死に対する AGA-HNG (配列番号：42) の効果を示す図である。様々な濃度の AGA-HNG の存在下または非存在下、初代培養神経を 25  $\mu$ Mの $\text{A}\beta$  1-43で処理 (パネルB) するか、またはF11細胞に V642I APP、NL-APP、M146L PS-1、またはN141I PS-2 cDNAをトランスフェクト (パネルC~F) し、72時間後にトリパンブルー排除アッセイにより細胞死を測定した。 $\text{A}\beta$  を用いた初代培養神経の実験においては、コントロールとして様々な濃度の HNG を用いて同様の実験を行った。「no T」はトランスフェクションしていない細胞、「pcDNA」は空ベクターをトランスフェクトした細胞の結果である。各パネルは全て3回の独立した実験の平均±S.D.を示す。

出願人履歴情報

識別番号 [899000079]

1. 変更年月日 1999年 9月17日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区三田2丁目15番45号

氏 名 学校法人 慶應義塾